

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

VANESSA BORELLI SEEFELDT

**ESTUDO DA APLICAÇÃO DO LASER DE DIODO NA PREVENÇÃO E
CONTROLE DA EROÇÃO DENTÁRIA EXTRÍNSECA**

São José dos Campos, SP

2020

VANESSA BORELLI SEEFELDT

**ESTUDO DA APLICAÇÃO DO LASER DE DIODO NA PREVENÇÃO E
CONTROLE DA EROSÃO DENTÁRIA EXTRÍNSECA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Silva Soares

São José dos Campos, SP

2020

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Seefeldt, Vanessa Borelli

Estudo da aplicação do laser de diodo na prevenção e controle da erosão dentária extrínseca / Vanessa Borelli Seefeldt, orientador, Prof. Dr. Luis Eduardo Silva Soares. - São José dos Campos, SP, 2020.

1 CD-ROM, 64 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Dentes - Erosão. 3. Microscopia eletrônica de varredura. 4. Espectroscopia. I. Soares, Prof. Dr. Luis Eduardo Silva, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Vanessa Borelli Seefeldt, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 26 de Agosto de 2020.

Vanessa Borelli Seefeldt

Autor(a) da Obra

Data da defesa: ____/____/____

VANESSA BORELLI SEEFELDT

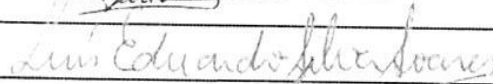
**“ESTUDO DA APLICAÇÃO DO LASER DE DIODO NA PREVENÇÃO E CONTROLE DA
EROSÃO DENTÁRIA EXTRÍNSECA.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

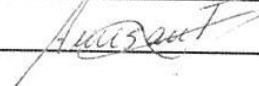
PROF.^ª DR.^ª LUCIANA BARROS SANT’ANNA



PROF. DR. LUÍS EDUARDO SILVA SOARES



PROF.^ª DR.^ª ANA MARIA DO ESPÍRITO SANTO - Unifesp



Prof.^ª Dr.^ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 01 de julho de 2020.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Números dos processos: 2005/50811-9 e 2007/07984-5).

À Universidade do Vale do Paraíba, Univap.

Ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) e seus funcionários.

Ao Laboratório de Odontologia e Materiais Aplicados (LOMA) e colegas.

Ao professor Rodrigo L. Martins, pela colaboração no empréstimo do aparelho de laser.

A Deus, pela dádiva da vida, pela saúde, proteção, força e oportunidades.

À Diva Maris Borelli (mãe), por dedicar a vida à minha formação, educação e evolução, e por nunca ter desistido de lutar por mim e por meus ideais.

Ao Professor Dr. Luís Eduardo Silva Soares, pelo acolhimento, por ser um exemplo de dedicação e por acreditar no meu desenvolvimento profissional.

Aos membros da banca, por disponibilizarem tempo e disposição para estarem aqui lapidando e enriquecendo este projeto, e por demonstrarem amor e carinho pela pesquisa, me motivando e inspirando.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original”

(Albert Einstein)

RESUMO

A erosão dentária é uma lesão de origem não cariosa, crônica e pontual. Pode ter como causa extrínseca a dissolução de minerais da superfície dental por ação química de ácidos e quelantes presentes em alimentos industrializados, alimentos ácidos e alguns medicamentos. Dentre as fontes intrínsecas pode-se citar as doenças que acometem o trato gastrointestinal. A desmineralização decorrente por erosão torna o elemento dental mais suscetível aos desgastes mecânicos da escovação, mastigação, apertamento e bruxismo, resultando em sintomatologia álgica e fragilidade dentária. A terapia mais tradicional e acessível para os pacientes é a utilização do flúor. Como alternativa para prevenir os possíveis sinais e sintomas da erosão dentária, pode-se lançar mão da irradiação laser, para modificar quimicamente a superfície dental e aumentar a resistência à desmineralização. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a influência da irradiação com laser de Diodo ($\lambda=830\text{nm}$), na prevenção e controle da erosão dentária induzida, em esmalte de dentes bovinos. Noventa e seis amostras de esmalte bovino foram preparadas e divididas em 8 grupos experimentais ($n = 12$): grupo 1 – controle negativo (saliva, AS), grupo 2 – controle positivo (flúor gel neutro, FG), grupo 3 – laser Diodo 1 (L1), grupo 4 – laser Diodo 2 (L2), grupo 5 - flúor + laser 1 (FG-L1), grupo 6 – flúor + laser 2 (FG-L2), grupo 7 – laser 1 + flúor (L1-FG), grupo 8 – laser 2 + flúor (L2-FG). As amostras dos grupos 2, 5 e 6 receberam uma aplicação de flúor gel anterior aos procedimentos experimentais e ciclagem erosiva. Nos grupos 7 e 8, o flúor foi aplicado após a irradiação laser. Após os tratamentos as amostras foram submetidas à ciclagem erosiva em suco de laranja (desmineralização) e saliva artificial (remineralização). As amostras foram submetidas às análises por espectroscopia de micro fluorescência de raios x por energia dispersiva ($\mu\text{-EDXRF}$), rugosidade de superfície e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Diferenças significativas nas comparações iniciais e finais para o elemento cálcio (Ca) foram encontradas nos grupos G3 ($P<0,01$) e G8 ($P<0,001$) e para o fósforo, somente no grupo G8 ($P<0,01$). Entre a relação Ca/P, foram observadas diferenças significativas nos grupos G1 ($P<0,05$), G2($P<0,01$), G3 ($P<0,001$), G4 ($P<0,001$) e G6 ($P<0,001$). Nas comparações entre o grupo controle negativo (G1) e os demais grupos, foram observadas diferenças significativas para G8, com menores valores de Ca, P e Ca/P ($P<0,001$), e maiores valores de Ca e P para G3 ($P<0,001$). Entre o grupo controle positivo (G2) e os demais grupos, foram constatados valores significativamente menores de Ca e P para G8 ($P<0,001$) e maiores valores de Ca e P para G3 ($P<0,01$). Entre a relação Ca/P, foram constatadas diferenças significativas e menores valores nas comparações entre o grupo G2 e G8 ($P<0,001$), G5 ($P<0,05$) e G7 ($P<0,05$). Nos mapeamentos em área, maiores teores de Ca e P foram observados nos grupos 3 e 4 e o menores valores de Ca para os grupos 2, 5, 6, 7 e 8. Tais resultados foram mantidos para o elemento P, contudo, com menor evidência. Os tratamentos com a associação laser / flúor resultaram em valores médios de rugosidade mais baixos (R_a , μm) do que no controle negativo ($P<0,05$). O tratamento com L1 produziu valores mais altos de R_a no esmalte do que no controle positivo ($P<0,05$). As micrografias obtidas por MEV mostraram evidente desmineralização no esmalte após os tratamentos com AS (controle negativo) e FG (controle positivo) e erosão no suco de laranja em comparação com os grupos irradiados por laser. Deste modo, a irradiação com laser de Diodo de 830 nm em baixas potências, com ou sem associação ao flúor, e nos parâmetros adequados, promove modificações na estrutura cristalina do esmalte, tendo sido observadas melhores coberturas de superfícies nos grupos G4 (L2) e G6 (LF-2).

Palavras-chave: Erosão dentária. Laser. Rugosidade. Microscopia eletrônica de varredura. Espectroscopia de Micro fluorescência de raios x por energia dispersiva

Evaluation of Diode laser application in the prevention and control of extrinsic dental erosion

Abstract

Dental erosion is a non-carious, chronic and punctual lesion. It may have as an extrinsic cause the dissolution of minerals on the dental surface by chemical action of acids and chelators present in industrialized foods, acidic foods and some medications. Among the intrinsic sources can be mentioned the diseases that affect the gastrointestinal tract. The demineralization resulting from erosion makes the dental element more susceptible to mechanical wear from brushing, chewing, squeezing and bruxism, resulting in pain symptoms and tooth fragility. The most traditional and accessible therapy for patients is the use of fluoride. As an alternative to prevent possible signs and symptoms of dental erosion, laser irradiation can be used to chemically modify the dental surface and increase resistance to demineralization. Thus, the present study aimed to evaluate, *in vitro*, the influence of irradiation with Diode laser ($\lambda = 830\text{nm}$), in the prevention and control of induced dental erosion, in bovine teeth enamel. Ninety-six bovine enamel samples were prepared and divided into 8 experimental groups ($n = 12$): group 1 - negative control (saliva, AS), group 2 - positive control (neutral fluoride gel, FG), group 3 - Diode laser 1 (L1), group 4 - Diode 2 laser (L2), group 5 - fluoride + laser 1 (FG-L1), group 6 - fluoride + laser 2 (FG-L2), group 7 - laser 1 + fluoride (L1 -FG), group 8 - laser 2 + fluoride (L2-FG). The samples from groups 2, 5 and 6 received a fluoride gel application prior to the experimental procedures and erosive cycling. In groups 7 and 8, fluoride was applied after laser irradiation. After the treatments, the samples were subjected to erosive cycling in orange juice (demineralization) and artificial saliva (remineralization). The samples were submitted to analysis by micro energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry (μ -EDXRF), surface roughness and scanning electron microscopy (SEM). Significant differences in the initial and final comparisons for the element calcium (Ca) were found in groups G3 ($P < 0.01$) and G8 ($P < 0.001$) and for phosphorus, only in group G8 ($P < 0.01$). Among the Ca / P ratio, significant differences were observed in groups G1 ($P < 0.05$), G2 ($P < 0.01$), G3 ($P < 0.001$), G4 ($P < 0.001$) and G6 ($P < 0.001$). In the comparisons between the negative control group (G1) and the other groups, significant differences were observed for G8, with lower values of Ca, P and Ca / P ($P < 0.001$), and higher values of Ca and P for G3 ($P < 0.001$). Among the positive control group (G2) and the other groups, significantly lower values of Ca and P for G8 ($P < 0.001$) and higher values of Ca for G3 ($P < 0.01$) were found. Between the Ca / P ratio, significant differences and lower values were found in the comparisons between the G2 and G8 ($P < 0.001$), G5 ($P < 0.05$) and G7 ($P < 0.05$) groups. In the area mappings, higher levels of Ca and P were observed in groups 3 and 4 and the lowest Ca values for groups 2, 5, 6, 7 and 8. Such results were maintained for element P, however, with lower evidence. The treatments with the laser / fluoride association resulted in lower mean values of roughness (R_a , μm) than in the negative control ($P < 0.05$). Treatment with L1 produced higher values of R_a in the enamel than in the positive control ($P < 0.05$). The micrographs obtained by SEM showed a clear loss of enamel after treatments with AS (negative control) and FG (positive control) and erosion in orange juice compared to the groups irradiated by laser. In this way, irradiation with 830 nm Diode laser at low powers, with or without association with fluoride, and in the appropriate parameters, promotes changes in the enamel crystalline structure, with better surface coverings in groups G4 (L2) and G6 (LF-2).

Keywords: Tooth erosion. Laser. Roughness. Scanning electron microscopy. μ -EDXRF

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Figura esquemática da morfologia do dente evidenciando o esmalte dental, dentina, cimento e polpa	16
Figura 2 – Fluxograma das etapas de preparação, seleção e tratamento das amostras.....	21
Figura 3 - Fotografia da máquina de corte de precisão utilizada no corte das amostras (A). Foto ilustrativa do processo de secção das amostras com disco de diamante. (B). Detalhe da secção coroa e raiz (C).	23
Figura 4 - Fotografia do equipamento de polimento (politriz) utilizada no polimento das amostras (A). Detalhe do refinamento do corte das coroas dentais com disco de diamante (B).	24
Figura 5 - Fotografia do equipamento de espectroscopia de micro fluorescência de raios x por energia dispersiva utilizado para selecionar as amostras e avaliar a composição mineral (A). Esquema ilustrativo dos componentes internos do equipamento (B).....	26
Figura 6 - Fotografia da placa contendo as amostras imersas em 3 mL de saliva artificial (A) e da estufa utilizada para armazenar as amostras de esmalte dental durante a etapa de remineralização (B).	27
Figura 7 - Fotografia ilustrando o equipamento de laser utilizado no experimento (A) e o suporte elaborado para a ponteira do laser (B).....	29
Figura 8 - Fotografia do gabarito confeccionado para focalizar a irradiação no centro das amostras.....	30
Figura 9 - Fotografia dos suportes acrílicos para irradiação das amostras em sequência.	30
Figura 10 - Representação esquemática das etapas do ciclo erosivo de desmineralização em suco de laranja (A), agitação por 10 min (B), remineralização em saliva artificial (C) e estufa por 1 hora (D).	32
Figura 11 - Fotografia do equipamento de rugosímetro utilizado na análise da rugosidade de superfície.	35
Figura 12 - Fotografia do processo de metalização das amostras com ouro (A). Fotografia das amostras metalizadas e prontas para a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (B). Fotografia do aparelho de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (C).	37
Figura 13 - Fotografia do equipamento de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	38
Figura 14 - Imagens representativas da distribuição de cálcio (Ca) na superfície após os tratamentos obtidas por microanálise por μ -EDXRF. G1 (A), G2 (B), G3 (C), G4 (D), G5 (E), G6 (F), G7 (G) e G8 (H). O gradiente na intensidade da escala de cores indica variações no conteúdo de Ca, de modo que locais com maior conteúdo mineral são mostrados em vermelho e laranja, enquanto locais com menor conteúdo mineral são mostrados em tons de azul. Destaca-se os grupos 3 (C) e 4 (D) com maior conteúdo inorgânico.....	43

Figura 15 - Imagens representativas da distribuição de fósforo (P) na superfície após os tratamentos obtidas por microanálise por μ -EDXRF. G1 (A), G2 (B), G3 (C), G4 (D), G5 (E), G6 (F), G7 (G) e G8 (H). O gradiente na intensidade da escala de cores indica variações no conteúdo de P, de modo que locais com maior conteúdo mineral são mostrados em vermelho e laranja, enquanto locais com menor conteúdo mineral são mostrados em tons de azul. Destacase os grupos 3 (C) e 4 (D) com maior conteúdo inorgânico.....44

Figura 16 - Micrografias representativas (1000x) da superfície do esmalte dos grupos 1 a 4: G1 – saliva (A), G2 – flúor (B), G3 – Laser1 (C) e G4 – Laser2 (D). Após os ciclos de erosão e remineralização, a superfície do esmalte do grupo controle negativo apresenta prismas de esmalte evidenciados (A) e o grupo controle positivo apresenta áreas com prismas de esmalte expostos com diferentes padrões de dissolução (setas brancas – periferia e setas amarelas – centro) (B). Os grupos tratados com laser com túbulos resultaram em uma camada depositada sobre os prismas de esmalte (C e D). Barra de escala: 10 μ m.....47

Figura 17 - Micrografias representativas (1000x) da superfície do esmalte dos grupos 5 a 8: G5 – flúor + Laser1 (A), G6 – flúor + Laser2 (B), G7 – Laser1 + flúor (C) e G8 – Laser2 + flúor (D). Após os ciclos de erosão e remineralização, a superfície do esmalte do G5 (A) e G7 (C) apresentam superfícies de esmalte mais homogêneas sem exposição dos prismas em comparação aos grupos 6 (B) e 8 (D). Os grupos 6 e 8 apresentam cobertura espessa, porém irregular, com regiões com maior concentração de material (setas amarelas, B e D) e regiões sem depósito de material espesso (setas brancas, D). Barra de escala: 10 μ m.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Divisão dos grupos experimentais de acordo com o tipo de tratamento de superfície.	25
Tabela 2 – Parâmetros da irradiação laser.	28
Tabela 3 - Sequência dos tratamentos de cada grupo experimental.	33
Tabela 4 - Média e desvio padrão (D.P.) (n = 10) de Ca e P (% em peso) e relação Ca/P do esmalte obtido por meio do mapeamento em linha de μ -EDXRF de acordo com as medidas do grupo experimental antes (i) e após (f) erosão. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as leituras inicial (i) e final (f) (p <0,05).40	40
Tabela 5 - Análise estatística das medidas de μ -EDXRF dos componentes inorgânicos do esmalte, entre as leituras inicial e final.	41
Tabela 6 - Análise estatística das medidas de μ -EDXRF dos componentes inorgânicos do esmalte, entre os grupos controle (G1) e experimental (G2-G8).	41
Tabela 7 - Média e desvio padrão (D.P.) (n = 10) da rugosidade média (Ra, μ m) do esmalte obtido por meio das medidas de rugosidade superficial, de acordo com o grupo experimental após tratamentos de superfície e erosão. Valor de P resultante das comparações estatísticas pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett, realizadas entre controle negativo (1) e grupos experimentais e controle positivo e grupos irradiados (2).	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

DES-RE – Des-remineralização

LASER– *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação)

Lm – Limite de Medição

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

R – Perfil de Rugosidade

Ra – Rugosidade Média

μ -EDXRF – Espectroscopia de Micro Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DOS TECIDOS DENTAIS	16
3.2	EROSÃO DENTÁRIA.....	17
3.3	TERAPIA TRADICIONAL: FLUORTERAPIA	18
3.4	APLICAÇÃO DO LASER NA EROSÃO DENTÁRIA.....	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	21
4.2	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	23
4.3	EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL	24
4.4	ANÁLISE DO CONTEÚDO INORGÂNICO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS POR μ -EDXRF	24
4.5	APLICAÇÃO DO FLÚOR E IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS	26
4.6	EROSÃO DAS AMOSTRAS	31
4.7	RUGOSIDADE DE SUPERFÍCIE	35
4.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	36
4.9	ANÁLISE DE DADOS	38
5	RESULTADOS	39
5.1	MAPEAMENTO EM LINHA SEMIQUANTITATIVO	39
5.2	MAPEAMENTO EM ÁREA QUALITATIVO.....	42
5.3	RUGOSIDADE DE SUPERFÍCIE	45
5.4	MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA	46
6	DISCUSSÃO.....	49
7	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

Com uma recente mudança em hábitos alimentares e estilo de vida, vêm-se observando um aumento de casos de erosão dentária. Tais lesões podem ser classificadas como extrínsecas ou intrínsecas, de acordo com sua etiologia (IMFELD, 1996; LUSSE; JÄGGI, 2008; DE-MELO *et al.*, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2012).

Estas lesões, de origem não bacteriana, irreversíveis e localizadas, promovem a dissolução de minerais da superfície dos dentes pela ação constante de ácidos juntamente com a ação mecânica de hábitos fisiológicos, como mastigação e higienização dental e hábitos parafuncionais, como o bruxismo e apertamento dental (IMFELD, 1996; MOYNIHAN, 2005; CATELAN; GUEDES; DOS SANTOS, 2010; ZHONG *et al.*, 2013; GANSS; LUSSE; SCHLUETER, 2014; HARA; ZERO, 2014; FALLER; NOBLE, 2018; MOURA *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2018).

Ao entrarem em contato com a estrutura dental, os ácidos desmineralizam a matriz inorgânica dos dentes causando um acentuado desgaste e enfraquecimento de suas superfícies propiciando perda da estética e sensações álgicas, resultante da exposição dos túbulos dentinários (NUNN, 1996; LUSSE *et al.*, 2004; ORCHARDSON; GILLAM, 2006; WEST, 2008; CATELAN; GUEDES; DOS SANTOS, 2010; LEME *et al.*, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2012; LOPES; EDUARDO; ARANHA, 2015; GIACOMINI *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2019).

Por este motivo tornam-se dificultosos os atos da mastigação, deglutição e escovação, que geram além de um déficit nutricional, uma condição precária de higiene bucal, podendo acarretar no acúmulo de alimentos e bactérias nos dentes, culminando no desenvolvimento de lesões de cárie e doenças periodontais (BISHOP *et al.*, 1997; CATELAN; GUEDES; DOS SANTOS, 2010; LOPES; EDUARDO; ARANHA, 2015).

Desta forma, destaca-se a importância de se manter um equilíbrio na dieta, evitando o alto consumo de alimentos contendo ácidos e quelantes, bem como acompanhamento odontológico e médico para rápido diagnóstico e controle dos fatores que agravam tais lesões. (SOBRAL *et al.*, 2000; AMAECHI E HIGHAM, 2005; LUSSE E HELLWIG, 2006; CARNEIRO *et al.*, 2012; RAMALHO *et al.*, 2013).

Sabe-se que interferências na produção e eliminação de ácidos estomacais reduzem significativamente a produção do biofluido salivar e causam uma diminuição no pH bucal e na capacidade tampão da saliva, capacidade esta que regula e neutraliza o pH da cavidade bucal. (SHELLIS; ADDY, 2014; FALLER; NOBLE, 2018).

Com a diminuição destas propriedades da saliva, pode-se observar uma deficiência na produção da película adquirida, que apresenta a função de recobrir e proteger os dentes contra a ação dos ácidos o que permitiria, portanto, o desenvolvimento e progressão das lesões erosivas (SHELLIS; ADDY, 2014; FALLER; NOBLE, 2018).

Habitualmente, a terapia de escolha para prevenção e controle das lesões de erosão dentária é a aplicação de produtos fluoretados para formar uma barreira mineral, pelo depósito desses agentes na superfície do esmalte erodido ou não, permitindo maior resistência aos ácidos e mantendo armazenados componentes inorgânicos como cálcio e flúor que poderão ser liberados caso haja contato dos dentes com ácidos (VAN RIJKOM *et al.*, 2003; WIEGAND; ATTIN, 2003; GANSS *et al.*, 2004; WEGEHAUPT *et al.*, 2011; SAR SANCAKLI *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2018; 2019).

Contudo, como alternativa para a terapia com flúor pode-se lançar mão da irradiação com laser, a qual vem emergindo na área odontológica pois trata-se de uma terapia não invasiva, indolor e relativamente simples (LEPRI *et al.*, 2013; RAMOS-OLIVEIRA *et al.*, 2014; MOURA *et al.*, 2018).

Esta terapia alternativa sugere uma diminuição da desmineralização do esmalte dental a partir do aumento da resistência dos dentes aos ácidos e quelantes (DE-MELO *et al.*, 2011). Deste modo, foram verificados em estudos anteriores que dentes irradiados com laser, em comprimentos de onda no espectro do vermelho e infravermelho, poderiam minimizar a dissolução mineral de dentes submetidos à desafios ácidos severos, pelo aumento da dureza do esmalte (VLACIC, MEYERS E WALSH, 2007; DE-MELO *et al.*, 2011).

No entanto, verificou-se a partir de estudos *in vitro*, que a associação do laser de Diodo em altas e baixas potências, com agentes fluoretados pode promover uma proteção adicional aos dentes contra a ação de ácidos (VILLALBA-MORENO *et al.*, 2007; VLACIC, MEYERS, KIM, *et al.*, 2007).

Não se sabe ao certo qual o real mecanismo de ação desta associação, contudo, a explicação mais plausível seria a formação de um reservatório de fluoreto de cálcio nos túbulos dentinários, evitando a progressão da desmineralização e, conseqüentemente, o enfraquecimento dentário e sintomatologia álgica (TEN CATE, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Vlacic *et al.* (2007) em seu estudo, irradiaram amostras com um laser de Diodo, 830nm, e associaram à aplicação de gel de fluoreto de sódio a 1,23%, e concluíram que houve um aumento da proteção do esmalte contra os ácidos e houve também a redução da perda mineral do esmalte dental.

Já Aharari *et al.* (2018) utilizaram um laser de Diodo, 810nm e associaram a irradiação com produtos fluoretados e obtiveram como resultado o aumento da microdureza no esmalte, confirmando assim, a eficácia da associação laser-flúor.

Deste modo, a terapia de irradiação com laser, com ou sem influência da ação de produtos fluoretados, é eficaz na promoção do aumento da dureza do esmalte, assim como a redução da perda mineral causada por processos erosivos sendo, portanto, eficiente na prevenção e controle da sintomatologia dolorosa, perda de estética e amolecimento da estrutura dentária.

Optou-se pelo uso do laser de Diodo em baixas potências, pela maior facilidade de acesso em clínica odontológica, tendo em vista os baixos custos, e pela redução de efeitos térmicos deletérios (VLACIC; MEYERS, KIM, *et al.*, 2007; KHOUJA *et al.*, 2017).

Por estes motivos, tornam-se necessários estudos que avaliem a ação da irradiação laser de forma isolada e associada ao flúor, na prevenção e controle da erosão dentária extrínseca.

O presente estudo avaliou tais condições por meio da análise do teor de Ca e P por espectroscopia de micro fluorescência de raios x por energia dispersiva (μ -EDXRF), rugosidade de superfície e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo principal avaliar a influência da irradiação com laser de Diodo no comprimento de onda de $\lambda 830$ nm e tempos de 62s e 124s, na prevenção e controle de lesões de erosão dentária em esmalte de dentes bovinos permanentes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análise da textura de superfície (rugosidade) após erosão e tratamentos com o laser de Diodo isoladamente ou associado ao flúor;
- Análise dos componentes inorgânicos, cálcio e fósforo, por espectroscopia de micro espectroscopia de fluorescência de raios x por energia dispersiva (μ -EDXRF) após erosão e tratamentos com o laser de Diodo isoladamente ou associado ao flúor;
- Caracterizar a morfologia da superfície do esmalte dentário por microscopia eletrônica de varredura (MEV) após erosão e tratamentos com o laser de Diodo isoladamente ou associado ao flúor;

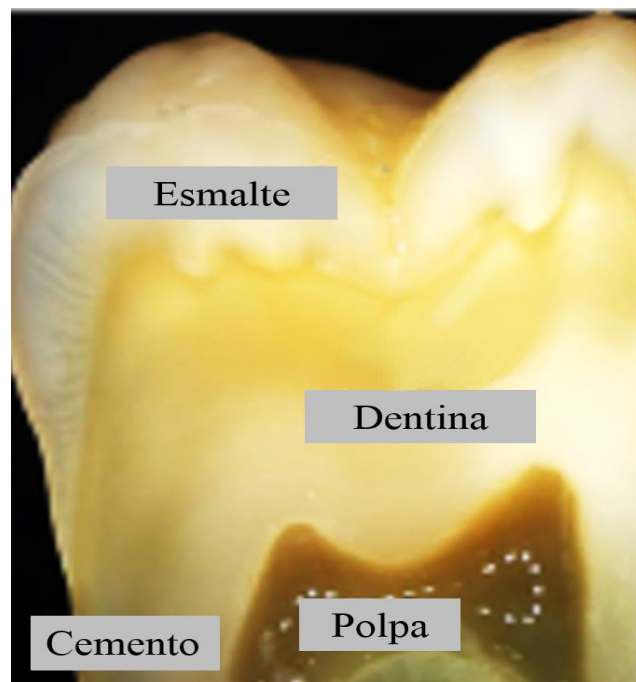
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DOS TECIDOS DENTAIS

O esmalte dental é composto por 96% de cristais de hidroxiapatita, 3% água e 1% matéria orgânica. Apresenta clinicamente, grande rigidez, translucidez, opalescência e fluorescência e recobre a dentina (BOSKEY; MENDELSON, 2005; LOPES; EDUARDO; ARANHA, 2015; PRETORIUS *et al.*, 2020).

A dentina é constituída por 50% de cristais de hidroxiapatita, 30% colágeno e 20% de água, sendo menos mineralizada quando comparada ao esmalte dental. A dentina caracteriza-se por possuir certa rigidez e permeabilidade devido aos microtúbulos que compõem sua estrutura. Assemelha-se quimicamente à estrutura do cimento, sendo este um tecido conjuntivo e isento de vascularização, formado por 50% de cristais de hidroxiapatita e fibras colágenas (Figura 1) (KATCHBURIAN; ARANA, 2017; MULLAN *et al.*, 2017; NAHORNY *et al.*, 2017).

Figura 1 – Figura esquemática da morfologia do dente evidenciando o esmalte dental, dentina, cimento e polpa.



Fonte: Adaptado de Nahorny, (2017b).

3.2 EROSÃO DENTÁRIA

As lesões de erosão dentária são oriundas da dissolução dos tecidos mineralizados dos dentes pela ação de ácidos e quelantes presentes na alimentação ácida e industrializada e de acometimentos que prejudicam a produção e excreção do biofluido salivar (ZHONG *et al.*, 2013; HARA; ZERO, 2014; LUSSI; CARVALHO, 2014; MOAZZEZ; BARTLETT, 2014; FALLER; NOBLE, 2018).

Tais lesões não possuem envolvimento bacteriano e são irreversíveis. Podem ser classificadas como extrínsecas e intrínsecas, de acordo com sua etiologia (IMFELD, 1996; CATELAN; GUEDES; DOS SANTOS, 2010).

As lesões de origens extrínsecas são derivadas de alimentos e bebidas ácidos e cítricos, presentes na alimentação contemporânea, artificial e industrializada, e do uso de medicamentos que afetam a saliva (BISHOP *et al.*, 1997; SHIPLEY; TAYLOR; MITCHELL, 2005; CATELAN; GUEDES; DOS SANTOS, 2010; CARNEIRO *et al.*, 2012).

Em contraponto, as lesões de origens intrínsecas são provenientes da ação do ácido clorídrico, produzido pelo próprio organismo, e apresentam-se em contato com os dentes em problemas gastrointestinais como a bulimia, anorexia, refluxo gastroesofágico, regurgitações e alcoolismo (SHIPLEY; TAYLOR; MITCHELL, 2005; BARTLETT; SHAH, 2006; CARNEIRO *et al.*, 2012; MOURA *et al.*, 2018).

Clinicamente, as regiões mais afetadas pelo desgaste erosivo são as superfícies cervicais. Isto pode decorrer de uma higienização inadequada pelo excesso de pressão da escova contra os dentes, permitindo a ação prolongada de ácidos extrínsecos, fator etiológico dessas lesões (RANDAZZO; AMORMINO; SANTIAGO, 2006; LIMA, 2010; GOMES, 2017).

Outros focos de lesões podem ser observados, como por exemplo lesões nas superfícies linguais de dentes anteriores e posteriores e lesões que acometem as faces vestibulares em sua totalidade, que são advindas da ação do ácido clorídrico pela regurgitação ou vômito. Já as lesões que comprometem parcialmente as faces vestibulares e lesões cervicais, são de origens extrínsecas, mais especificamente, alimentares (GARONE FILHO; SILVA, 2008; CARNEIRO *et al.*, 2012)

Como meio de prevenir tais lesões, torna-se imprescindível a diminuição do tempo e da constância de exposição dos ácidos aos dentes. Desta forma, medidas como orientação nutricional e de higiene bucal, rápido diagnóstico e suporte médico e psicológico são de extrema importância (SOBRAL *et al.*, 2000; MAGALHÃES *et al.*, 2009; CARNEIRO *et al.*, 2012; COMAR *et al.*, 2015).

Contudo, estes fatores, destacando-se o equilíbrio na dieta e hábitos de higiene bucal, dependem exclusivamente da aderência do paciente, o que muitas vezes não acontece. Por este motivo, o uso do flúor se torna uma medida importante ao alcance dos profissionais e dos pacientes, que tem o intuito de aumentar a resistência dentária aos ácidos (GANSS *et al.*, 2004; COMAR *et al.*, 2015).

3.3 TERAPIA TRADICIONAL: FLUORTERAPIA

Atualmente, a terapia mais comumente utilizada para controle e prevenção das lesões de erosão dentária é a aplicação de produtos contendo flúor. Esta aplicação permite que ocorra uma deposição de fluoreto de cálcio (CaF_2) na superfície dentária alterando a superfície e aumentando assim a resistência à desmineralização ácida (WIEGAND; ATTIN, 2003; GANSS *et al.*, 2004; WAHENGAM; TIKKU; LEE, 2011; SAR SANCAKLI *et al.*, 2015; MANTILLA *et al.*, 2017).

Os métodos mais utilizados são a aplicação nas formas tópica, dentifrícios, enxaguantes bucais, vernizes e géis. A fluoroterapia promove a precipitação de cristais de CaF_2 aumentando a retenção de minerais na superfície dos dentes, permitindo que haja uma liberação desses íons frente a um ataque ácido, aumentando a remineralização (WIEGAND; ATTIN, 2003; GANSS *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2017; MANTILLA *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2018).

Soares e De Carvalho Filho. (2015), utilizaram vernizes contendo flúor, e gel de fluoreto neutro a 2%, e aplicaram em amostras de dentes bovinos que foram submetidas à erosão ácida por suco de laranja. Os vernizes foram mantidos por 6h em contato com os dentes, e o gel de fluoreto neutro foi mantido por 4 min. Após o desafio ácido, foram realizadas as análises de rugosidade (Ra), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e espectroscopia de micro fluorescência de raios x por energia dispersiva (μ -EDXRF). Os autores concluíram que todos os tratamentos com aplicação de agentes fluoretados promoveram algum grau de proteção ao esmalte dental.

No estudo publicado por Carneiro *et al.* (2012), incisivos bovinos foram tratados com 3 marcas diferentes de vernizes fluoretados, por 5 min. Após a aplicação, as amostras foram expostas à ácidos e em seguida foram removidos os vernizes. A partir da análise por MEV, concluiu-se que os 3 vernizes utilizados no estudo conferiram proteção ao esmalte dental após o desafio ácido.

Contudo, a resistência da superfície dentária aos ácidos extrínsecos após a aplicação de flúor não é tão promissora, pois não permite uma resistência prolongada em condições *in vitro* (GANSS; SCHLUETER; KLIMEK, 2007; COMAR *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2018).

Por este motivo, novos meios de promoção do aumento da resistência do esmalte aos ácidos vêm sendo estudados. Dessa forma, a terapia com irradiação a laser vem despertando interesse na área odontológica pois permite a associação ou não, do laser ao flúor, conferindo maior dureza à estrutura dentária (LEPRI *et al.*, 2013; RAMOS-OLIVEIRA *et al.*, 2014; MOURA *et al.*, 2018).

3.4 APLICAÇÃO DO LASER NA EROÇÃO DENTÁRIA

O acrônimo laser conceitua-se como *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, sendo uma luz monocromática, coerente e colimada, tendo a capacidade de ser absorvida pelos tecidos gerando efeitos fotoquímicos e fotofísicos. Vem emergindo na área odontológica por ser uma terapia eficaz, indolor e relativamente simples (LINS *et al.*, 2010; CHAND; KULKARNI; MISHRA, 2016).

Estudos anteriores utilizaram a terapia com laser para prevenir e controlar lesões de erosão dentária, pois sabe-se que a interação da luz com os tecidos pode vir a aumentar a resistência dos dentes aos ácidos extrínsecos e intrínsecos, impedindo a desmineralização, sensibilidade dentária e diminuindo transtornos na mastigação e deglutição (TSAI *et al.*, 2002; CHAND; KULKARNI; MISHRA, 2016).

Grande parte dos estudos utilizam terapias com laser de alta potência, que atuam aumentando a temperatura do tecido irradiado podendo sofrer desnaturação da matriz orgânica, diminuindo assim a permeabilidade do esmalte (HSU *et al.*, 2000; CHAND; KULKARNI; MISHRA, 2016), e fusão e recristalização dos tecidos (SCHMIDLIN *et al.*, 2007; LEPRI *et al.*, 2013).

Contudo, além de possuírem altos custos, o que os torna inviáveis para o uso em clínica, a irradiação com geração de calor, advinda dos lasers de alta potência, pode causar efeitos deletérios à polpa dentária (VLACIC, MEYERS, KIM, *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2008; DE-MELO *et al.*, 2011).

Desta forma, uma outra linha de estudos vem utilizando lasers de baixa potência em condições como a prevenção e controle da erosão dentária, visto que essa fonte de luz não promove aumentos nocivos na temperatura dos tecidos irradiados, possuem custos mais baixos

e uma maior facilidade de operação (VLACIC, MEYERS, KIM, *et al.*, 2007; AHRARI *et al.*, 2018).

No intuito de promover uma proteção adicional aos efeitos da ação dos ácidos, pode-se associar a irradiação laser à agentes fluoretados, que podem fornecer aos tecidos dentários um aumento na incorporação de flúor (VILLALBA-MORENO *et al.*, 2007; VLACIC, MEYERS, KIM, *et al.*, 2007).

Embora tenham utilizado altas potências, o estudo de Vitale *et al.* (2011) utilizou um laser de Diodo, em 809nm, com potência de 2W, e irradiaram amostras de 20 pré-molares humanos com a associação ao flúor, antes e após a irradiação laser. Este estudo demonstrou que houve aumento significativo na absorção de flúor em ambos os grupos, permitindo concluir que a irradiação pré ou pós tratamento com flúor, é uma medida preventiva eficaz contra a desmineralização dentária.

Alguns poucos estudos com baixas potências foram realizados, e puderam ser observadas diminuições na desmineralização do esmalte dental, aumento da resistência dos dentes aos ácidos e aumento da microdureza do esmalte (VLACIC, MEYERS, KIM, *et al.*, 2007; AHRARI *et al.*, 2018).

No estudo de Vlacic *et al.* (2007), molares e pré-molares humanos foram irradiados com diferentes comprimentos de onda, destacando o laser de Diodo, 830nm, o qual foi associado à aplicação de gel de fluoreto de sódio a 1,23%. Após a irradiação, as amostras foram submetidas ao desafio erosivo e pôde-se observar um aumento da proteção do esmalte e redução da perda mineral.

Ahrari *et al.* (2018) utilizaram 56 amostras de pré-molares, que foram irradiadas com um laser de Diodo, 810nm, com potência de 0.5W, por 90s, e fizeram a associação da irradiação à produtos fluoretados e concluíram que houve um aumento da microdureza no esmalte.

Desta forma entende-se que novos estudos utilizando lasers de baixa potência e diferentes comprimentos de onda são necessários, contudo, os poucos resultados obtidos com essas fontes de luz são promissores, indicando que a irradiação laser deve ser mais explorada e testada a fim de se obter resultados mais precisos acerca da interação da luz laser em baixas potências com a prevenção e controle de lesões erosivas extrínsecas e intrínsecas.

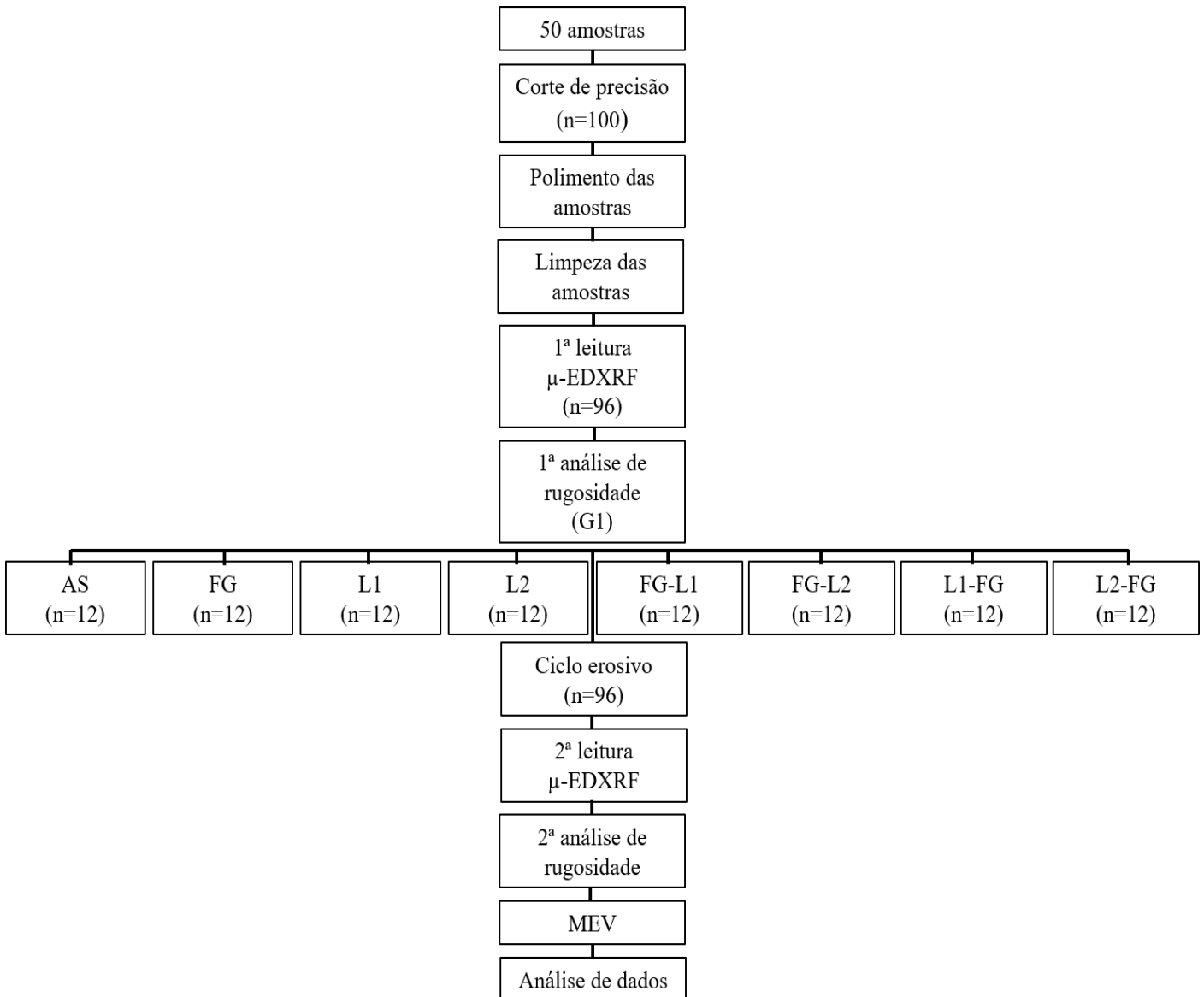
4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa trata-se de um estudo experimental, *in vitro*, utilizando dentes bovinos incisivos extraídos, descontaminados e preparados.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Noventa e seis amostras de esmalte bovino foram preparadas e divididas em 8 grupos experimentais (n = 12): grupo 1 – controle negativo (saliva, AS), grupo 2 – controle positivo (flúor gel neutro, FG), grupo 3 – laser Diodo 1 (L1), grupo 4 – laser Diodo 2 (L2), grupo 5 - flúor + laser 1 (FG-L1), grupo 6 – flúor + laser 2 (FG-L2), grupo 7 – laser 1 + flúor (L1-FG), grupo 8 – laser 2 + flúor (L2-FG). As etapas de preparação, seleção e tratamento das amostras são descritas no fluxograma apresentado na Figura 2.

Figura 2 – Fluxograma das etapas de preparação, seleção e tratamento das amostras

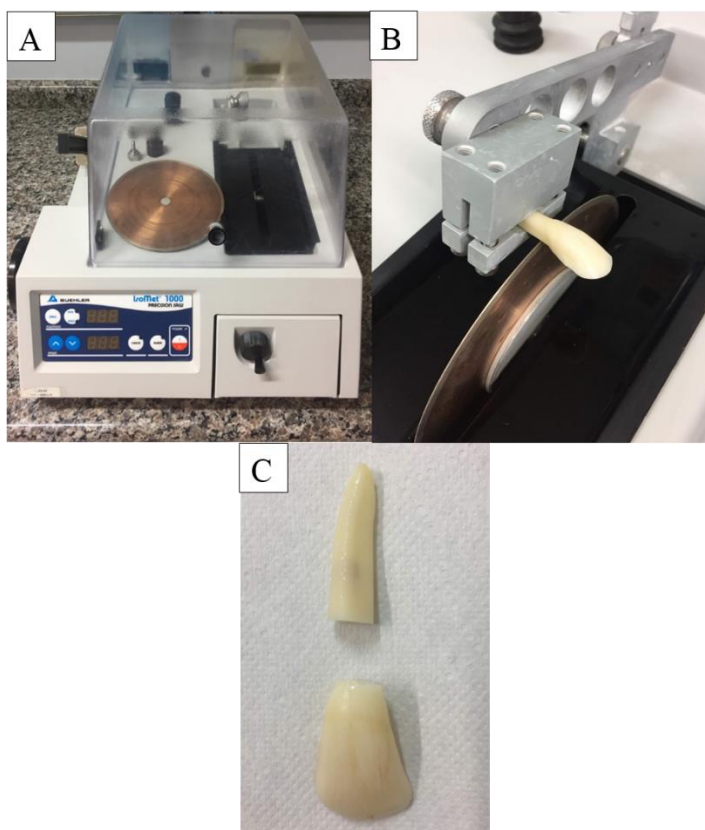


Fonte: Autor

4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

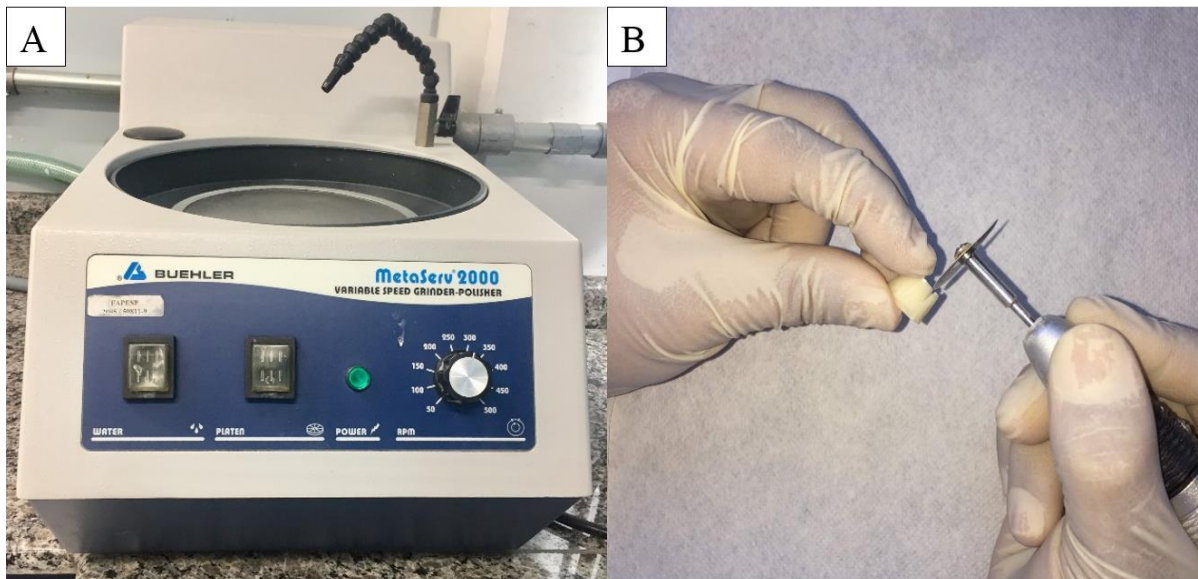
Foram utilizadas 50 amostras de dentes incisivos bovinos, que foram preparadas após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, protocolo nº A03/CEUA2019) (ANEXO A). As amostras foram seccionadas por uma máquina de corte de precisão (IsoMet 1000 Buehler®, Lake Bluff, IL, EUA), com disco de diamante e refrigeração, velocidade de 275 rpm e um contrapeso de 100g, para separar a coroa da raiz (Figura 2 A, B e C). Na sequência as amostras de coroa dental foram cortadas em duas porções obtendo-se 100 amostras com dimensões aproximadas de 8 x 8mm. Todas as amostras foram polidas a fim de se obter superfícies lisas e paralelas, em uma politriz (Metaserv 2000, Buehler®), em velocidade de 300 rpm (lixa d'água nº 600 e nº 1200, 3M®, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 3 A e B). Após o polimento, as amostras foram colocadas num ultrassom (MaxiClean-1450, Merse®, Campinas, SP, Brasil), no interior de um Becker contendo água, durante 10 minutos, para a limpeza das mesmas (SOARES *et al.*, 2018).

Figura 3 - Fotografia da máquina de corte de precisão utilizada no corte das amostras (A). Foto ilustrativa do processo de secção das amostras com disco de diamante. (B). Detalhe da secção coroa e raiz (C).



Fonte: Autor

Figura 4 - Fotografia do equipamento de polimento (politriz) utilizada no polimento das amostras (A). Detalhe do refinamento do corte das coroas dentais com disco de diamante (B).



Fonte: Autor

4.3 EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL

Para a completa proteção individual durante o manejo das amostras e para evitar a contaminação das mesmas, preconizou-se o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI): avental, máscara, gorro, luvas e óculos de proteção.

Em relação ao uso do aparelho de laser, preconizou-se o uso de óculos de proteção com um filtro de comprimento de onda equivalente ao do laser Diodo ($\lambda 830$ nm) a fim de evitar danos à retina do operador.

4.4 ANÁLISE DO CONTEÚDO INORGÂNICO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS POR μ -EDXRF

Após toda a etapa de preparação das amostras, uma análise semi-quantitativa foi realizada por um espectrômetro de micro fluorescência de raios x por energia dispersiva (μ -EDXRF, modelo μ -EDX 1300 Shimadzu, Kyoto, Japão) com o objetivo de verificar comparativamente o teor cálcio (Ca) e o fósforo (P) das 100 amostras preparadas e assim proceder com a separação dos grupos experimentais em grupos homogêneos.

Os teores de Ca e P (% em peso) das amostras foram avaliadas por mapeamentos de linha de superfície (n = 100) antes dos tratamentos para seleção de amostras (1ª leitura).

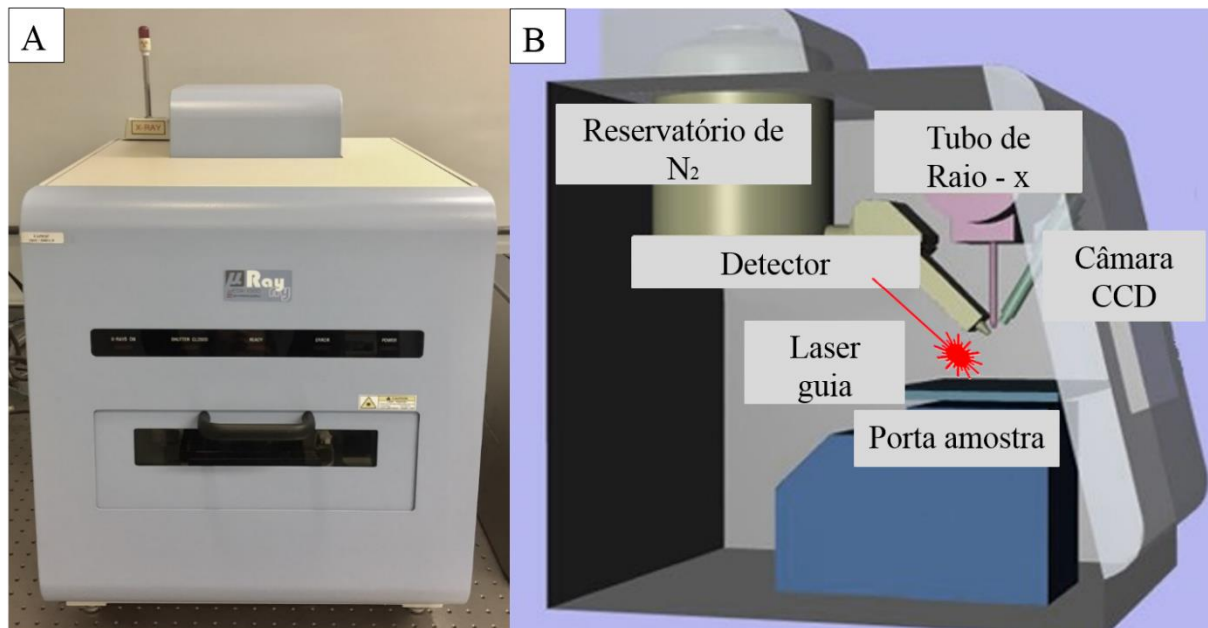
Os mapeamentos em linha cobriram uma região central da amostra selecionada de 300 × 1 pontos (passos de 20 µm, 10s por ponto, 15 kV). A análise estatística dos resultados foi realizada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer usando GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego CA, EUA). As 4 amostras com conteúdo inorgânico fora da média foram excluídas. Em seguida, os espécimes de esmalte foram alocados aleatoriamente em oito grupos de 12 espécimes cada (n = 96) (Tabela 1). Após os tratamentos de irradiação laser e erosão, as 2ª leituras de µ-EDXRF foram realizadas repetindo-se os mesmos parâmetros da leitura inicial (n = 96) (Figura 4 A e B) (SOARES *et al.*, 2018). Uma amostra de cada grupo foi escolhida para realizar um mapeamento em área de superfície para análise qualitativa da distribuição dos componentes inorgânicos no esmalte tratado e submetido aos ciclos. Os mapeamentos em área (n =8) foram realizados cobrindo uma região central da amostra (40 x 30 pontos, passos de 20 µm, 5s por ponto, 15 kV).

Tabela 1 - Divisão dos grupos experimentais de acordo com o tipo de tratamento de superfície.

GRUPOS	TRATAMENTOS
1- CONTROLE NEGATIVO	(AS) SALIVA ARTIFICIAL
2- CONTROLE POSITIVO	(FG) FLÚOR GEL NEUTRO 2%
3- LASER DIODO 1	(L1) Irradiação Diodo 830 nm, 6,2J
4- LASER DIODO 2	(L2) Irradiação Diodo 830 nm, 12,4J
5- FLÚOR + LASER1	(FG-L1) flúor gel neutro 4min + laser 1
6- FLÚOR + LASER2	(FG-L2) flúor gel neutro 4min + laser 2
7- LASER1 + FLÚOR	(L1-FG) laser 1 + flúor gel neutro 4 min
8- LASER2 + FLÚOR	(L2-FG) laser 2 + flúor gel neutro 4 min

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5 - Fotografia do equipamento de espectroscopia de micro fluorescência de raios x por energia dispersiva utilizado para selecionar as amostras e avaliar a composição mineral (A). Esquema ilustrativo dos componentes internos do equipamento (B).



Fonte: Elaborado pela autora.

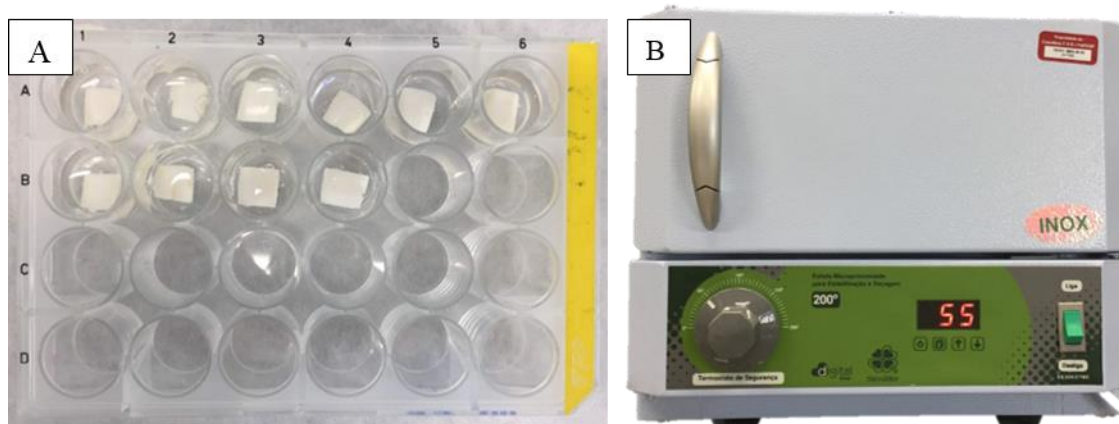
4.5 APLICAÇÃO DO FLÚOR E IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS

Todos os grupos passaram por uma etapa inicial de imersão em saliva artificial a fim de simular condições reais de uma cavidade bucal e induzindo a formação da película adquirida de acordo com o protocolo previamente publicado na literatura (WANG *et al.*, 2018).

Todas as amostras dos 8 grupos experimentais passaram pelos 6 ciclos de erosão ao fim de cada tratamento.

As amostras do grupo controle negativo (AS) não passaram por nenhum tratamento de superfície, contudo, foi submetido à imersão em 3 mL de saliva artificial por 12h, em estufa a 37°C e, decorrido este tempo, foi submetido ao processo de erosão dentária (Figura 5 A e B).

Figura 6 - Fotografia da placa contendo as amostras imersas em 3 mL de saliva artificial (A) e da estufa utilizada para armazenar as amostras de esmalte dental durante a etapa de remineralização (B).



Fonte: Elaborado pela autora

No grupo 2 (controle positivo, FG), as amostras de esmalte foram imersas em 3 mL de saliva artificial por 6h, em estufa a 37°C, seguido da aplicação de flúor gel neutro a 2% (DFL, flúor gel 2%, DFL Indústrias e Comércio S.A, Jacarepaguá, RJ, Brasil). Aguardou-se o produto agir por 4 min, e em seguida procedemos a remoção dos excessos de flúor com gaze, lavagem com água destilada após 30 min. e imersão novamente em 3 mL de saliva artificial por mais 6h em estufa a 37°C. Esta armazenagem em saliva, seguido do tempo de tratamento com flúor e novamente da armazenagem em saliva foram realizados com o intuito de simular o protocolo de aplicação de flúor em consultório e o efeito da saliva na cavidade bucal. Esta aplicação foi realizada com base em protocolo prévio (WANG *et al.*, 2018). Após esta etapa, o grupo controle positivo foi submetido ao processo de erosão.

Previamente ao início das irradiações, foi realizado um trabalho piloto para a seleção e padronização dos parâmetros de irradiação do laser de Diodo seguindo os parâmetros utilizados em um estudo prévio (MOGHADAM *et al.*, 2018). Os testes foram feitos utilizando o comprimento de onda de 830 nm, alterando-se somente o tempo, a energia e a densidade de energia.

Este comprimento de onda foi escolhido a fim de se evitar um grande aumento de temperatura, além do limite crítico de 5,5 °C, que poderia culminar na necrose pulpar (VLACIC, MEYERS; WALSH, 2007).

As amostras dos grupos 3 (L1) e 4 (L2) foram imersas em saliva artificial por 12h, em estufa a 37°C, e passaram somente pelo tratamento com laser. O grupo 3 (L1) recebeu a

irradiação laser com uma energia de 6,2J (Tabela 2). O grupo 4 (L2) recebeu a irradiação laser com uma energia de 12,4J (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros da irradiação laser.

PARÂMETROS	Laser 1	Laser 2
COMPRIMENTO DE ONDA (nm)	830 ± 20	830 ± 20
ENERGIA (J)	6,2	12,4
POTÊNCIA ÚTIL (W)	1	1
POTÊNCIA (mW)	100	100
ÁREA DO PONTO (cm²)	0,028	0,028
DENSIDADE DE ENERGIA (J/cm²)	222	444
NÚMERO DE PONTOS	Varredura	Varredura
DENSIDADE DE POTÊNCIA (W/cm²)	3,57	3,57
TEMPO DE TRATAMENTO (s)	62	124

Fonte: Elaborado pela autora.

Nos grupos 5 (FG-L1) e 6 (FG-L2) as amostras de esmalte receberam uma aplicação de flúor gel neutro a 2% anterior aos procedimentos experimentais restantes. Ambos foram imersos em saliva artificial por 6h (WANG *et al.*, 2018), em estufa a 37°C, seguida da aplicação de flúor gel, remoção dos excessos de flúor com gaze, lavagem com água destilada após 30 min, imersão em saliva artificial por 6h em estufa a 37°C e irradiação com laser de Diodo com energia de 6,2J para o grupo 5, e energia de 12,4J para o grupo 6.

As amostras dos grupos 7 (L1-FG) e 8 (L2-FG), foram imersas em saliva artificial por 12h. Em seguida, o grupo 7 teve suas amostras irradiadas com laser com uma energia de 6,2J (Tabela 2), e as amostras do grupo 8 foram irradiadas com uma energia de 12,4J do laser de Diodo (Tabela 2).

Após a irradiação, as amostras de esmalte dos grupos 7 e 8 foram imersas em saliva por 6h em estufa a 37°C. Na sequência, foi aplicado o flúor gel neutro por 4 min, removido o excesso com gaze. Decorrido um tempo de 30 min, foi realizada a lavagem das amostras com água destilada, e imersão novamente em saliva artificial por mais 6h.

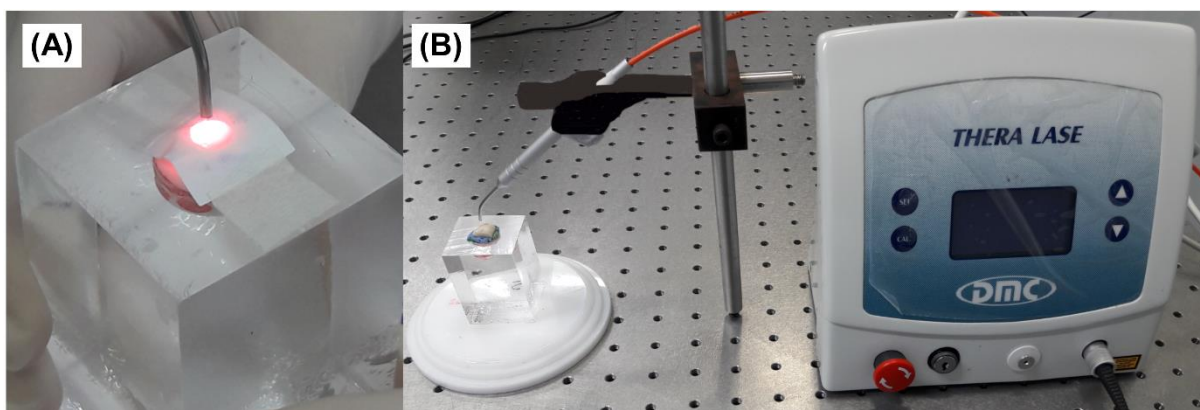
Para os grupos que foram irradiados, o comprimento de onda utilizado foi de 830 nm, potência de 100mW, área do ponto de 0,028cm², modo varredura e densidade de potência de 3,57W/cm². Nos grupos 3, 5 e 7 o tempo de irradiação foi de 62 segundos para cada amostra.

Nos grupos 4, 6 e 8 o tempo de irradiação foi de 124 segundos para cada amostra.

Para o parâmetro Laser 1, foi utilizada uma energia de 6,2J e uma densidade de energia de 222J/cm². Para o parâmetro Laser 2, foi utilizada uma energia de 12,4J e uma densidade de energia 444J/cm² (Tabela 2). Os parâmetros de irradiação foram baseados em um estudo anterior no qual os autores utilizaram laser de diodo e flúor como tratamentos de superfície (MOGHADAM *et al.*, 2018).

Para padronizar a irradiação laser um dispositivo para fixar a ponteira do laser acima das amostras foi montado sobre uma bancada ótica (Figura 6 A e B). As amostras foram posicionadas num suporte acrílico para que ficassem estabilizadas durante a irradiação e para manter a superfície do esmalte dental à uma distância de 2,0mm da ponteira do laser (Figura 6 A e B). A ponteira do laser foi fixada no dispositivo para que permanecesse sempre na mesma posição igualmente para todas as amostras (Figura 6 A e B).

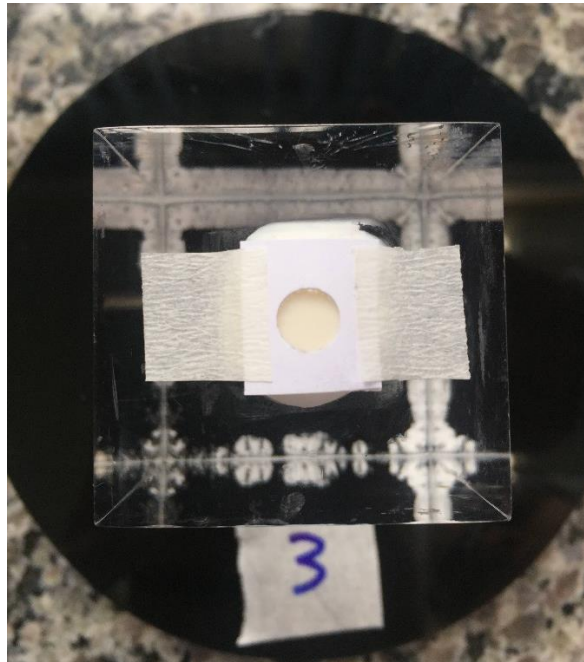
Figura 7 - Fotografia ilustrando o equipamento de laser utilizado no experimento (A) e o suporte elaborado para a ponteira do laser (B).



Fonte: Elaborado pela autora.

Para que a irradiação fosse realizada sempre no mesmo local, foi confeccionado um gabarito de papel, de forma circular, que foi posicionado ao centro das amostras, durante a irradiação. No parâmetro de irradiação 1 (L1) foram realizados 4 movimentos verticais dentro do gabarito, simulando um movimento de varredura, totalizando os 62 segundos (Figura 7).

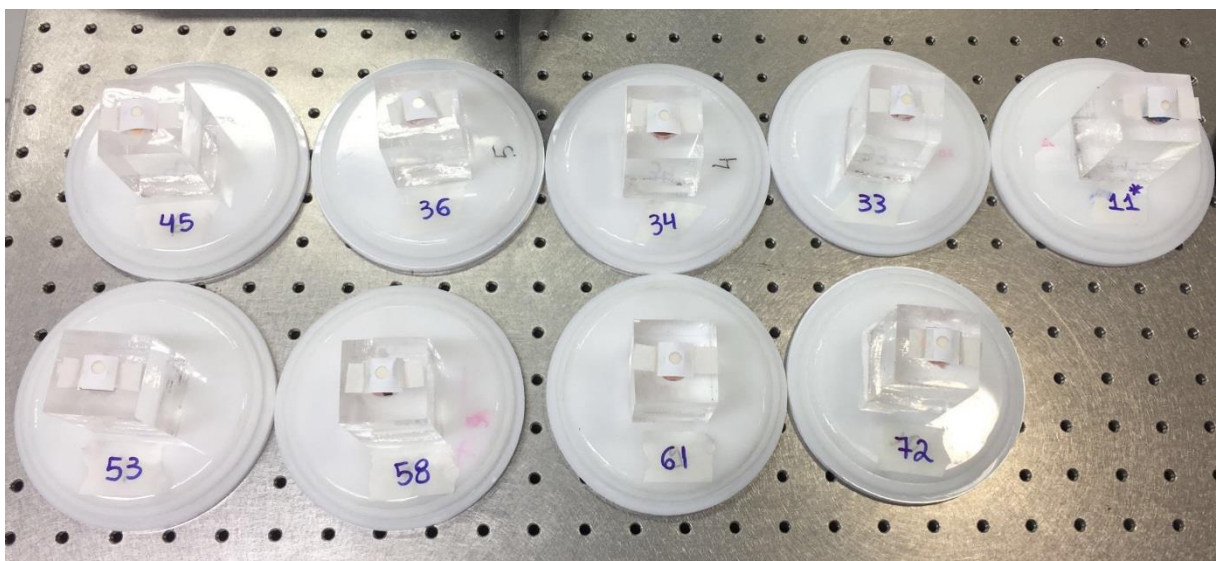
Figura 8 - Fotografia do gabarito confeccionado para focalizar a irradiação no centro das amostras.



Fonte: Elaborado pela autora.

As irradiações de cada amostra com este parâmetro foram realizadas em uma sequência, onde as amostras individualmente posicionadas nos suportes (n=12) eram irradiadas uma após a outra, com um intervalo aproximado de 60s entre cada amostra. Este foi o tempo estimado para a troca e posicionamento das amostras (Figura 8).

Figura 9 - Fotografia dos suportes acrílicos para irradiação das amostras em sequência.



Fonte: Elaborado pela autora.

No parâmetro de irradiação 2 (L2), as amostras foram irradiadas da mesma maneira do que o parâmetro L1. Entretanto, as amostras que receberam o tratamento com o parâmetro L2 foram irradiadas duas vezes seguidas, totalizando o tempo de 30 min, sendo 15 min para o primeiro ciclo de irradiação e 15 minutos para o segundo ciclo de irradiação (15 min para a irradiação de 12 amostras ou um grupo inteiro).

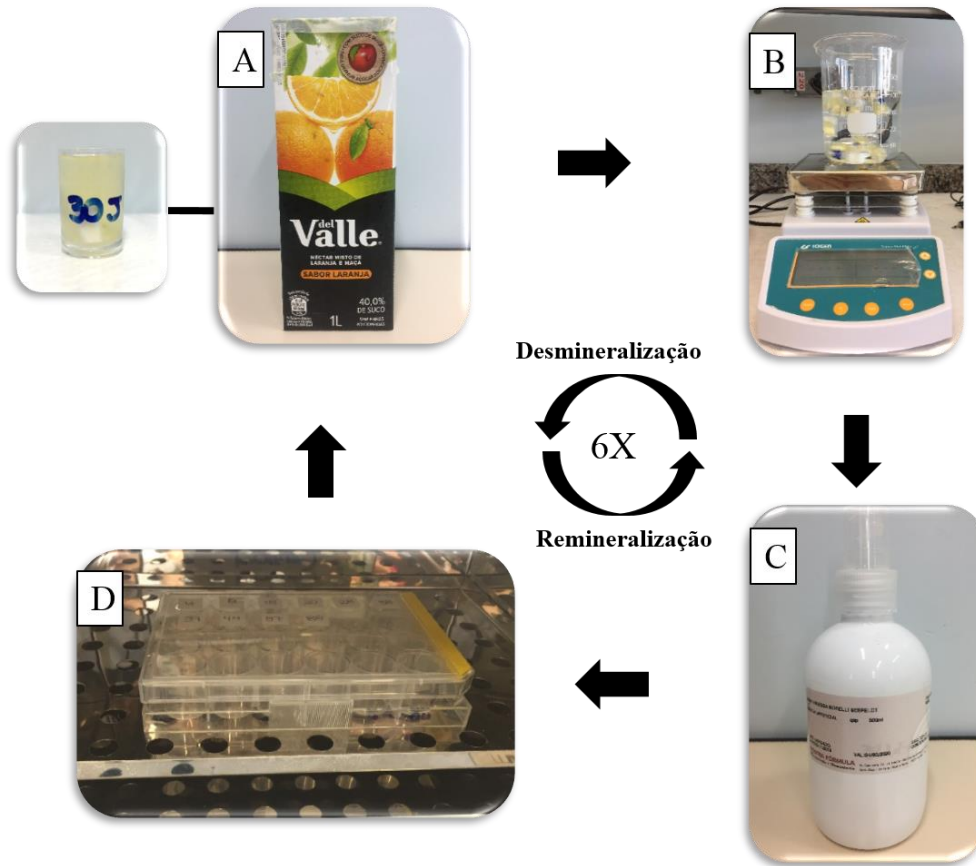
O equipamento utilizado para realizar a irradiação foi o laser cirúrgico Thera Lase Surgery (DMC, São Carlos, SP, Brasil, comprimento de onda 830 nm, potência máxima 100mW).

4.6 EROSÃO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras foram submetidas à 6 ciclos de des-remineralização (DES-RE) em suco de laranja (desmineralização) e saliva artificial (remineralização) para simular condições severas de uma erosão dentária extrínseca.

Os seguintes passos foram realizados para que o processo de ciclagem fosse concluído seguindo o protocolo estabelecido anteriormente (NAHORNY *et al.*, 2017): (1) desmineralização com 3 mL de suco de laranja (suco de laranja Del Valle, 30% suco natural de laranja e 10% suco de maçã, Leão Alimentos e Bebidas LTDA, Linhares, Espírito Santo, pH 3,6) por 10 min sob agitação magnética (37° C, 100 rpm, Modelo 752A, Fisatom Equipamentos Científicos, São Paulo, SP, Brasil); (2) remineralização com 3 mL de saliva artificial por 60 min a 37° C em uma estufa (Sterilifer SX 300 DTME, Diadema, São Paulo, SP, Brasil. A composição da saliva artificial foi: 1,5 mmol / L Ca (NO₃) 2 H₂O; Na₂HPO₄ 2H₂O a 0,9 mmol / L; 150 mmol / L de KCl; 0,1 mol / L de H₂NC (CH₂OH) 3 (TRIS); 0,05 mg mL⁻¹ de NaF, pH 7 (NAHORNY *et al.*, 2017) (Figura 9).

Figura 10 - Representação esquemática das etapas do ciclo erosivo de desmineralização em suco de laranja (A), agitação por 10 min (B), remineralização em saliva artificial (C) e estufa por 1 hora (D).



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3 - Sequência dos tratamentos de cada grupo experimental.

G1 (AS)	G2 (FG)	G3 (L1)	G4 (L2)
<ul style="list-style-type: none"> • Grupo controle negativo (AS). • Apenas armazenamento em saliva artificial por 12h, em estufa a 37°C (WANG <i>et al.</i>, 2018). • Ciclagem erosiva (NAHORNY <i>et al.</i>, 2017). 	<ul style="list-style-type: none"> • Grupo controle positivo (FG). • Imersão em saliva artificial por 6h, em estufa a 37°C (WANG <i>et al.</i>, 2018). • Flúor 2% por 4 min (WANG <i>et al.</i>, 2018). • Imersão em saliva artificial por 6h, em estufa a 37°C. • Remoção com gaze; • Aguardar 30 min para lavar com água destilada por 10s. • Ciclagem erosiva (NAHORNY <i>et al.</i>, 2017). 	<ul style="list-style-type: none"> • Imersão em saliva artificial por 12h, em estufa a 37°C (WANG <i>et al.</i>, 2018). • Lavagem com água destilada por 10s. • Laser Diodo 830nm, 6,2J, por 62s (MOGHADAM <i>et al.</i>, 2018). • Ciclagem erosiva (NAHORNY <i>et al.</i>, 2017). 	<ul style="list-style-type: none"> • Imersão em saliva artificial por 12h, em estufa a 37°C (WANG <i>et al.</i>, 2018). • Lavagem com água destilada por 10s. • Laser Diodo 830nm, 12,4J, por 124s (MOGHADAM <i>et al.</i>, 2018). • Ciclagem erosiva (NAHORNY <i>et al.</i>, 2017).

G5 (FG-L1)	G6 (FG-L2)	G7 (L1-FG)	G8 (L2-FG)
<ul style="list-style-type: none"> • Imersão em saliva artificial por 6h, em estufa a 37°C (WANG <i>et al.</i>, 2018). • Flúor 2% por 4 min (WANG <i>et al.</i>, 2018). • Remoção com gaze. • Aguardar 30 min para lavar com água destilada por 10s. • Imersão em saliva artificial por 6h, em estufa a 37°C. • Laser Diodo 830nm, 6,2J e 62s (MOGHADAM <i>et al.</i>, 2018). • Ciclagem erosiva (NAHORNY <i>et al.</i>, 2017). 	<ul style="list-style-type: none"> • Imersão em saliva artificial por 6h, em estufa a 37°C (WANG <i>et al.</i>, 2018). • Flúor 2% por 4 min (WANG <i>et al.</i>, 2018). • Remoção com gaze. • Aguardar 30 min para lavar com água destilada por 10s. • Imersão em saliva artificial por 6h, em estufa a 37°C. • Laser Diodo 830nm, 12,4J e 124s (MOGHADAM <i>et al.</i>, 2018). • Ciclagem erosiva (NAHORNY <i>et al.</i>, 2017). 	<ul style="list-style-type: none"> • Imersão em saliva artificial por 12h, em estufa a 37°C (WANG <i>et al.</i>, 2018). • Laser Diodo 830nm, 6,2J e 62s (MOGHADAM <i>et al.</i>, 2018). • Flúor 2% por 4 min (WANG <i>et al.</i>, 2018); • Remoção com gaze; • Aguardar 30 min para lavar com água destilada por 10s; • Ciclagem erosiva (NAHORNY <i>et al.</i>, 2017). 	<ul style="list-style-type: none"> • Imersão em saliva artificial por 12h, em estufa a 37°C (WANG <i>et al.</i>, 2018). • Laser Diodo 830nm, 6,2J e 62s (MOGHADAM <i>et al.</i>, 2018). • Flúor 2% por 4 min (WANG <i>et al.</i>, 2018). • Remoção com gaze; • Aguardar 30 min para lavar com água destilada por 10s; • Ciclagem erosiva (NAHORNY <i>et al.</i>, 2017).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.7 RUGOSIDADE DE SUPERFÍCIE

Foram realizadas duas análises de rugosidade de superfície para padronização e comparação dos resultados. A primeira análise foi feita após a seleção das amostras por μ -EDXRF com os espécimes do grupo controle negativo (AS) (n=12). A segunda análise foi realizada após a conclusão dos tratamentos e após a 2ª leitura por μ -EDXRF. A análise da rugosidade de superfície foi realizada em um rugosímetro (TR200 –QUALITEST) (Figura 10). Utilizou-se o parâmetro rugosidade média (Ra) que traduz o valor da média aritmética de todas as distâncias absolutas do perfil de rugosidade (R), desde a linha central, dentro da extensão de medida Lm (limite de medição = extensão considerada na leitura). O Lm considerado foi de 1,25mm, e o cut off de 0,25 mm. Cada amostra foi ser fixada e posicionada com o esmalte dental voltado para cima. Foram feitas 3 leituras por amostra (288 leituras), com uma distância de 15 μ m entre as mesmas. Após a obtenção das medidas de rugosidade por amostra foi calculada a média. Na sequência estes dados foram utilizados para a análise estatística (96 amostras) (SOARES *et al.*, 2018).

Figura 11 - Fotografia do equipamento de rugosímetro utilizado na análise da rugosidade de superfície.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

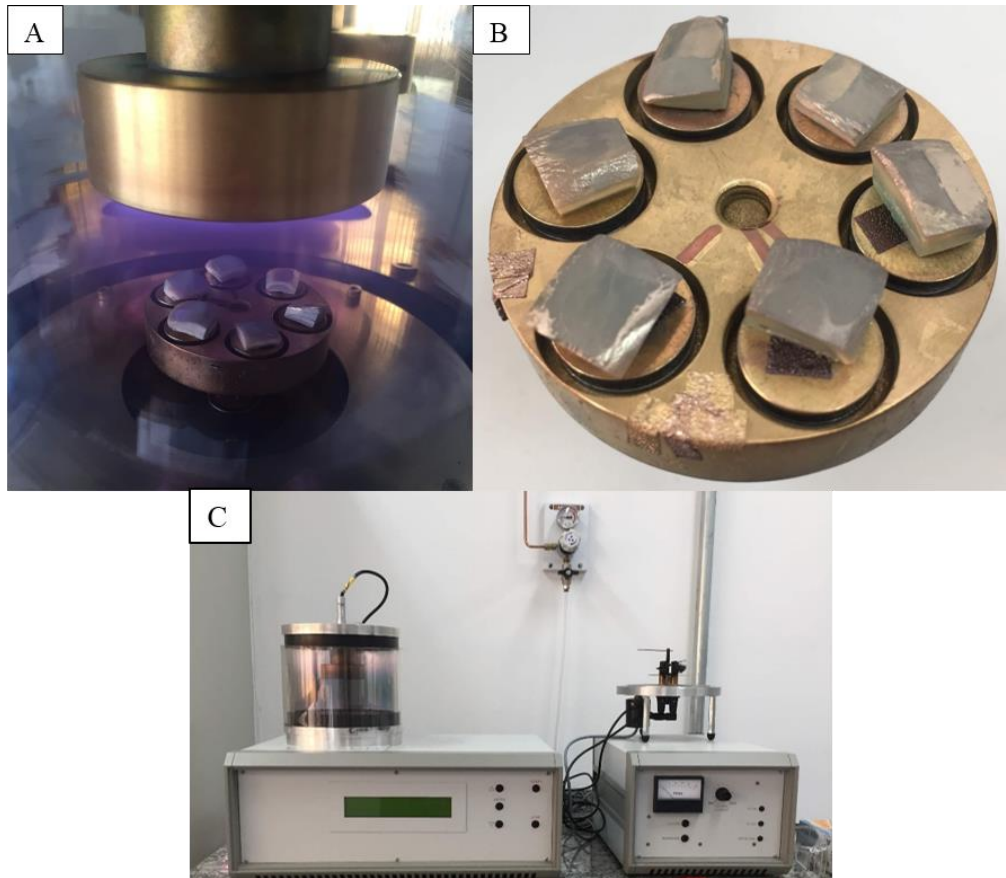
Duas amostras de cada grupo foram selecionadas para serem analisadas por MEV.

Anteriormente aos tratamentos e ciclos erosivos, as duas amostras de cada grupo selecionadas para a microscopia foram divididas em duas partes esquemáticas. Uma das metades foi protegida com resina composta (3M) e a outra metade foi protegida com uma matriz de poliéster somente durante a aplicação da resina composta. Em seguida a matriz de poliéster foi removida e esta metade da amostra recebeu o tratamento designado do grupo.

Esta parte protegida com resina foi realizada com o intuito de ser visualizada na microscopia como área não tratada. Posteriormente, as superfícies protegidas (referência padrão – região não tratada) e as não impermeabilizadas puderam ser visualizadas no microscópio eletrônico de varredura.

Inicialmente, as amostras foram desidratadas com etanol nas concentrações de 10%, 50%, 60%, 80% e 100% e, em seguida, foram mantidas em estufa a 37°C, por 1 semana, para a remoção de toda a água presente nas amostras. Após a secagem das amostras, as mesmas foram metalizadas com ouro em uma metalizadora à vácuo (EMITECH K550X, Ashford, Kent, Inglaterra) (Figura 11 A, B e C).

Figura 12 - Fotografia do processo de metalização das amostras com ouro (A). Fotografia das amostras metalizadas e prontas para a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (B). Fotografia do aparelho de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (C).



Fonte: Elaborado pela autora.

Após a metalização as amostras foram analisadas no equipamento de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (EVO-MA10, Carl STM Zeiss, Oberkochen, Germany) com uma tensão de aceleração de 20kV e com um aumento de 1000x, para verificar alterações nas superfícies do esmalte (Figura 12) (SOARES *et al.*, 2018).

Figura 13 - Fotografia do equipamento de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).



Fonte: Elaborado pela autora.

4.9 ANÁLISE DE DADOS

Os valores de μ -EDXRF e Ra foram analisados estatisticamente usando o GraphPad Prism (versão 5.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

Uma ANOVA unidirecional com o Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni comparou as porcentagens de peso de Ca e P (% em peso) e a relação Ca / P antes e após os tratamentos. O pós-teste de Dunnett foi realizado para comparar o controle negativo e outros tratamentos e o controle positivo e os grupos irradiados por laser. Os valores de Ra foram analisados estatisticamente comparando os dois grupos controle com os outros tratamentos pelo pós-teste de Dunnett.

5 RESULTADOS

5.1 MAPEAMENTO EM LINHA SEMIQUANTITATIVO

A tabela 4 apresenta os valores iniciais (*i*) e finais (*f*) dos componentes cálcio (Ca), fósforo (P) e entre a relação Ca/P de todos os grupos experimentais e seus respectivos desvios padrões (Tabela 4).

Na tabela 4, nas comparações entre os valores iniciais e finais observou-se diferenças estatísticas para o Ca somente nos grupos G3 e G8. Após os tratamentos, maiores valores de Ca foram observados nas amostras do G3 ($P < 0,01$) e menores valores nas amostras do G8 ($P < 0,001$).

Nas comparações entre os valores iniciais e finais para o fósforo, foram observadas diferenças estatísticas somente para o grupo G8 ($P < 0,01$), com menores valores do elemento após os tratamentos. Observou-se também, diferenças significativas entre os valores iniciais e finais para a relação Ca/P nos grupos G1 ($P < 0,05$), G2 ($P < 0,01$), G3 ($P < 0,001$), G4 ($P < 0,001$) e G6 ($P < 0,001$) (Tabela 5).

A tabela 6 apresenta as comparações estatísticas entre os grupos controle negativo (G1) e controle positivo (G2) e os demais grupos experimentais. Observa-se que houve significância estatística entre o grupo controle negativo (G1) e o G8, com menores valores de cálcio, fósforo e relação Ca/P para o G8 ($P < 0,001$). Para o G3 foram observados maiores valores de Ca e P na comparação com G1 (controle negativo) ($P < 0,001$).

Nas comparações estatísticas entre o grupo controle positivo (G2) e os grupos irradiados com laser, observou-se diferença estatística significativa em G8 e G3. Foram encontrados, com significância estatística, menores valores de Ca para G8 ($P < 0,001$) e maiores valores de Ca para G3 ($P < 0,01$). Para o fósforo, foi encontrada diferença significativa, com maiores valores para G3 e menores valores para o grupo G8 ($P < 0,001$).

Para a relação Ca/P, na comparação entre o grupo controle positivo e os grupos irradiados, menores valores significantes foram observados nos grupos G8 ($P < 0,001$), G5 ($P < 0,05$) e G7 ($P < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 4 - Média e desvio padrão (D.P.) (n = 10) de Ca e P (% em peso) e relação Ca/P do esmalte obtido por meio do mapeamento em linha de μ -EDXRF de acordo com as medidas do grupo experimental antes (i) e após (f) erosão. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre as leituras inicial (i) e final (f) ($p < 0,05$).

GRUPOS	Ca %	D.P.	P %	D.P.	Ca/P	D.P.
<i>G1 - i</i>	34,24	0,76	15,63	0,27	2,19 a	0,03
<i>G1 - f</i>	34,24	1,17	15,32	0,36	2,23 b	0,03
<i>G2 - i</i>	34,43	0,93	15,71	0,29	2,19 a	0,03
<i>G2 - f</i>	34,45	0,66	15,41	0,27	2,24 b	0,01
<i>G3 - i</i>	34,34 a	1,08	15,70	0,36	2,19 a	0,03
<i>G3 - f</i>	35,86 b	1,01	15,86	0,35	2,26 b	0,03
<i>G4 - i</i>	34,00	1,27	15,51	0,41	2,19 a	0,03
<i>G4 - f</i>	35,18	0,68	15,62	0,19	2,25 b	0,02
<i>G5 - i</i>	34,55	1,18	15,73	0,36	2,20	0,03
<i>G5 - f</i>	33,92	0,67	15,40	0,21	2,20	0,02
<i>G6 - i</i>	34,24	1,07	15,66	0,43	2,19 a	0,01
<i>G6 - f</i>	34,88	0,81	15,53	0,23	2,25 b	0,03
<i>G7 - i</i>	34,07	0,86	15,56	0,29	2,19	0,02
<i>G7 - f</i>	33,68	0,92	15,28	0,31	2,20	0,02
<i>G8 - i</i>	34,17 a	1,53	15,63 a	0,43	2,19	0,04
<i>G8 - f</i>	31,95 b	1,01	14,75 b	0,24	2,17	0,04

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5 - Análise estatística das medidas de μ -EDXRF dos componentes inorgânicos do esmalte, entre as leituras inicial e final.

<i>Comparações estatísticas</i>	<i>Ca</i>	<i>P</i>	<i>Ca/P</i>
<i>G1i vs. G1f</i>			P<0,05
<i>G2i vs. G2f</i>			P<0,01
<i>G3i vs. G3f</i>	P<0,01		P<0,001
<i>G4i vs. G4f</i>			P<0,001
<i>G5i vs. G5f</i>			
<i>G6i vs. G6f</i>			P<0,001
<i>G7i vs. G7f</i>			
<i>G8i vs. G8f</i>	P<0,001	P<0,01	

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 6 - Análise estatística das medidas de μ -EDXRF dos componentes inorgânicos do esmalte, entre os grupos controle (G1) e experimental (G2-G8).

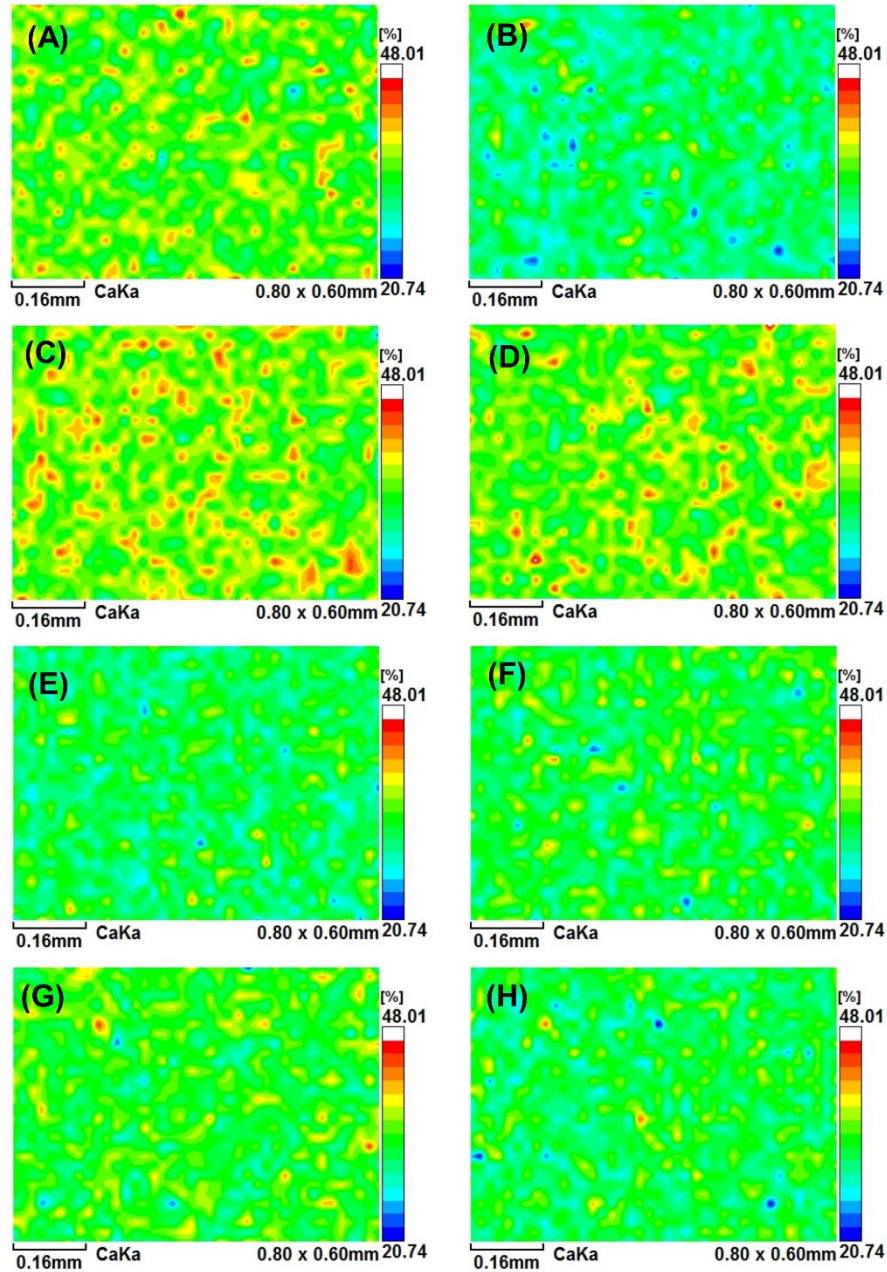
	<i>Comparações estatísticas</i>	<i>Ca</i>	<i>P</i>	<i>Ca/P</i>
<i>G1</i> (<i>Controle negativo</i>)	vs. G2			
	vs. G3	P<0,001	P<0,001	
	vs. G4			
	vs. G5			
	vs. G6			
	vs. G7			
	vs. G8	P<0,001	P<0,001	P<0,001
<i>G2</i> (<i>Controle positivo</i>)	vs. G3	P<0,01	P<0,01	
	vs. G4			
	vs. G5			P<0,05
	vs. G6			
	vs. G7			P<0,05
	vs. G8	P<0,001	P<0,001	P<0,001

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 MAPEAMENTO EM ÁREA QUALITATIVO

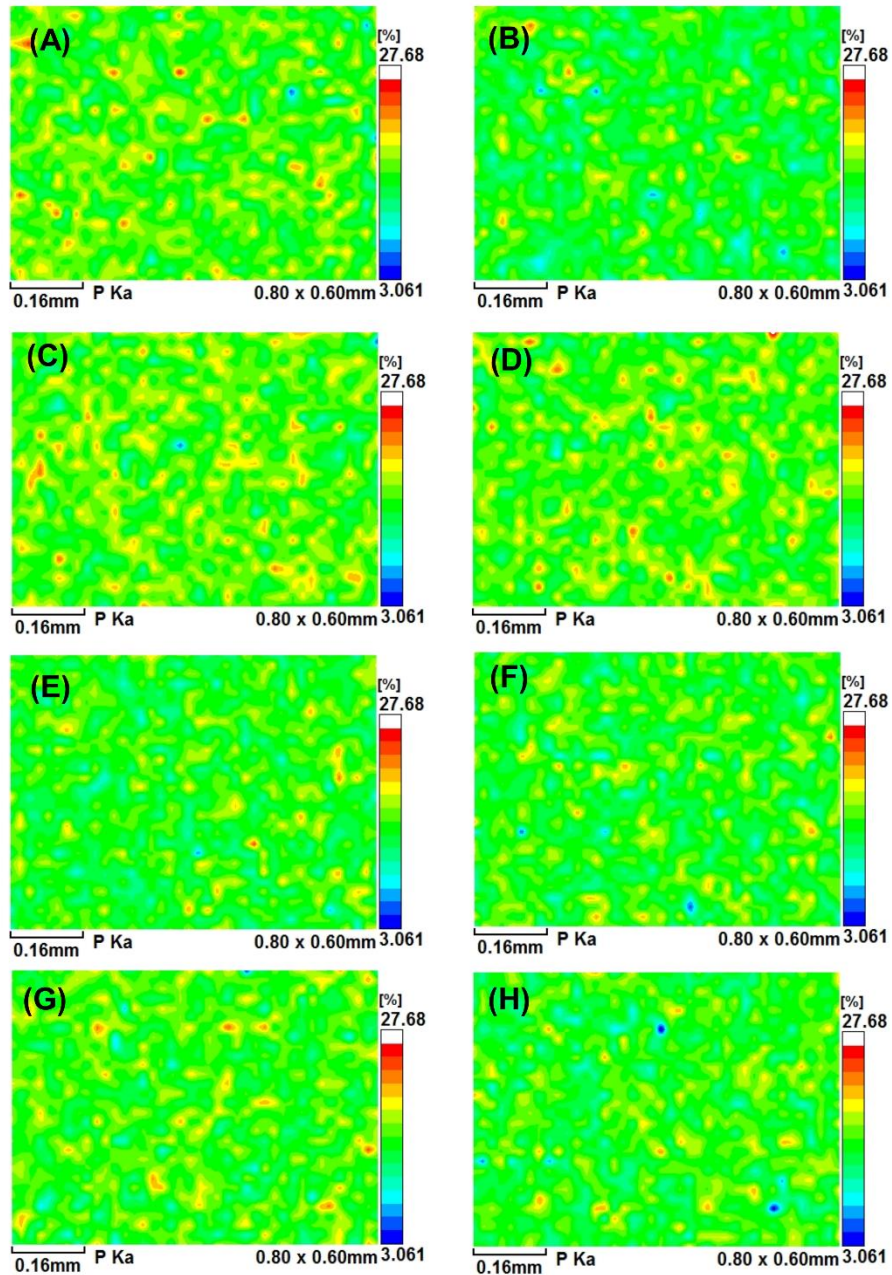
As figuras 13 e 14 mostram o resultado dos mapeamentos em área por μ -EDXRF do esmalte após os tratamentos e ciclos de erosão das amostras dos grupos 1 ao 8. Os mapeamentos químicos forneceram as concentrações relativas dos elementos inorgânicos cálcio (Figura 13) e fósforo (Figura 14) no esmalte dental bovino. A escala de cores nos mapas de distribuição representa as concentrações elementares: tons de azul representam as concentrações mínimas do elemento, enquanto as cores laranja e vermelho representam as concentrações máximas nos respectivos espectros componentes. Essas imagens de distribuição química destacam as diferenças no conteúdo inorgânico entre os grupos de tratamento. Destacam-se os grupos 3 (Figuras 13 e 14 C) e 4 (Figuras 13 e 14 D) com maiores teores de cálcio e fósforo. Os grupos 2, 5, 6, 7 e 8 apresentaram menores concentrações de cálcio na superfície (Figuras 14 B, E-H). Para o elemento fósforo o mesmo resultado foi observado, entretanto com menor evidência (Figuras 14 B, E-H).

Figura 14 - Imagens representativas da distribuição de cálcio (Ca) na superfície após os tratamentos obtidas por microanálise por μ -EDXRF. G1 (A), G2 (B), G3 (C), G4 (D), G5 (E), G6 (F), G7 (G) e G8 (H). O gradiente na intensidade da escala de cores indica variações no conteúdo de Ca, de modo que locais com maior conteúdo mineral são mostrados em vermelho e laranja, enquanto locais com menor conteúdo mineral são mostrados em tons de azul. Destaca-se os grupos 3 (C) e 4 (D) com maior conteúdo inorgânico.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 15 - Imagens representativas da distribuição de fósforo (P) na superfície após os tratamentos obtidas por microanálise por μ -EDXRF. G1 (A), G2 (B), G3 (C), G4 (D), G5 (E), G6 (F), G7 (G) e G8 (H). O gradiente na intensidade da escala de cores indica variações no conteúdo de P, de modo que locais com maior conteúdo mineral são mostrados em vermelho e laranja, enquanto locais com menor conteúdo mineral são mostrados em tons de azul. Destaca-se os grupos 3 (C) e 4 (D) com maior conteúdo inorgânico.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.3. RUGOSIDADE DE SUPERFÍCIE

A tabela 7 retrata, por meio do valor de p (1), o nível de significância estatística na comparação do grupo controle negativo (G1) com todos os outros grupos experimentais (G2-G8). O nível de significância estatística na comparação do grupo controle positivo (G2) com os grupos irradiados (G3-G8) é representado na tabela 7 pelo valor de p (2).

Observa-se que, para p (1), houve diferença significativa para os grupos $G8 < G5 < G7 < G6$, em ordem crescente de R_a , tendo o G8, o menor valor (0,100 μm) e G6 o maior valor (0,118 μm), em comparação com o grupo controle negativo (G1). Para o valor de p (2), observa-se que o único grupo experimental com diferença significativa foi o G3, com R_a de 0,156 μm , em comparação com o grupo controle positivo (G2) (Tabela 7).

Tabela 7 - Média e desvio padrão (D.P.) ($n = 10$) da rugosidade média (R_a , μm) do esmalte obtido por meio das medidas de rugosidade superficial, de acordo com o grupo experimental após tratamentos de superfície e erosão. Valor de P resultante das comparações estatísticas pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett, realizadas entre controle negativo (1) e grupos experimentais e controle positivo e grupos irradiados (2).

GRUPOS	R_a (μm)	D.P.	Valor de p (1)	Valor de p (2)
<i>G1</i>	0,152	0,027		
<i>G2</i>	0,125	0,033	-	
<i>G3</i>	0,156	0,013	-	P < 0,05
<i>G4</i>	0,151	0,025	-	-
<i>G5</i>	0,108	0,026	P < 0,001	-
<i>G6</i>	0,118	0,020	P < 0,05	-
<i>G7</i>	0,117	0,023	P < 0,01	-
<i>G8</i>	0,100	0,013	P < 0,001	-

Fonte: Elaborado pela autora.

5.4 MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram diferenças significativas na superfície do esmalte entre os diferentes tratamentos aplicados. No grupo controle negativo (G1, saliva artificial) a superfície do esmalte apresentou uma superfície irregular e parcial exposição dos prismas de esmalte (Figura 15A). Já a superfície do esmalte tratado com flúor gel neutro (G2, controle positivo) apresentou áreas com diferentes padrões de dissolução e exposição dos prismas de esmalte. Neste grupo a micrografia obtida por MEV mostrou que existem áreas com a dissolução da periferia dos prismas (Figura 15B, setas brancas) e áreas com a dissolução do centro dos prismas de esmalte (Figura 15B, setas amarelas).

Os tratamentos com laser com densidades de energia diferentes (G3, L1 e G4, L2) resultaram em padrões de alteração na superfície do esmalte distintos dos grupos controle positivo e negativo.

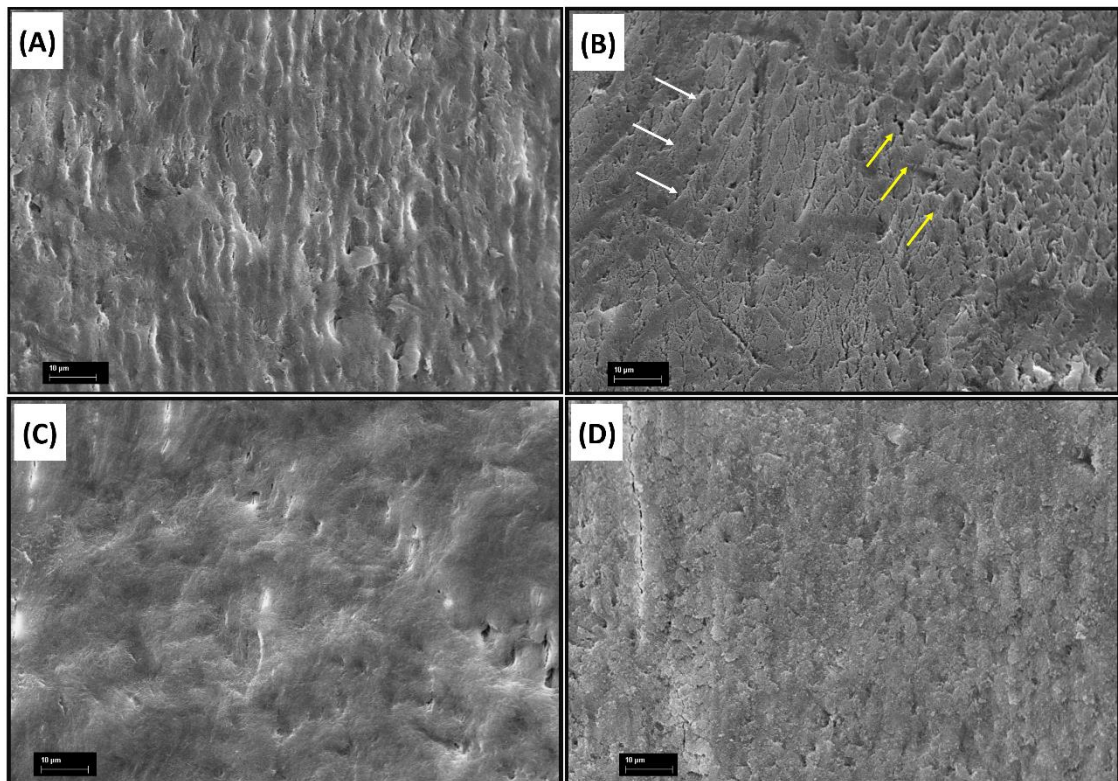
Na superfície do esmalte da amostra do grupo 3 (Laser 1), observa-se um aspecto de fusão dos prismas de esmalte em uma estrutura compacta e não permeável (Figura 15C). Na superfície do esmalte da amostra do grupo 4 (Laser 2), observa-se um aspecto de fusão dos prismas de esmalte, com a formação de uma camada mais espessa (Figura 15C) do que no grupo 3.

Na superfície do esmalte da amostra do grupo 5 (Flúor + L1) (Figura 15A), observa-se superfícies de esmalte mais homogêneas sem exposição dos prismas e com aspecto similar ao grupo 3. O tratamento com Flúor + L2 resultou em superfície de esmalte com uma camada de depósitos (Figura 16B) mais espessa do que em Flúor + L1 e sem exposição de prismas de esmalte.

O tratamento L1 + Flúor produziu uma superfície lisa sem exposição de prismas de esmalte (Figura 16C).

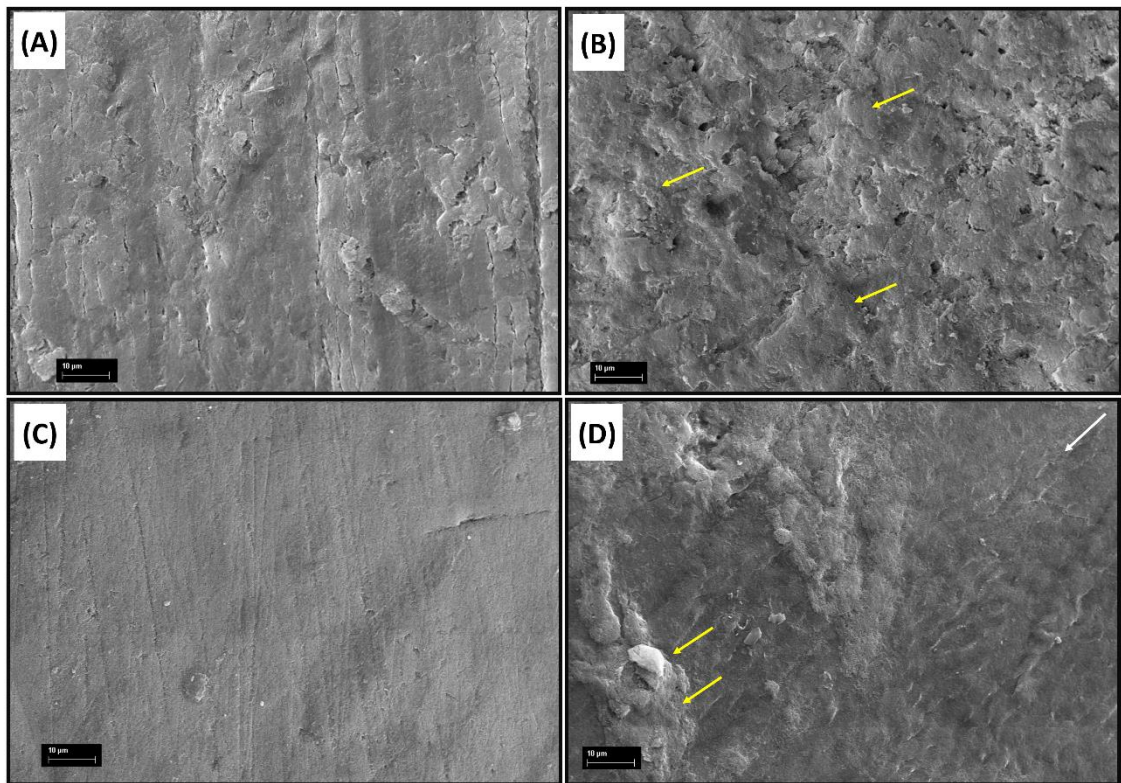
Os grupos 6 e 8 apresentam uma cobertura espessa sobre o esmalte, porém irregular, com regiões com maior concentração de material (setas amarelas, Figura 16 B e D) e regiões sem depósito de material espesso (setas brancas, Figura 16D).

Figura 16 - Micrografias representativas (1000x) da superfície do esmalte dos grupos 1 a 4: G1 – saliva (A), G2 – flúor (B), G3 – Laser1 (C) e G4 – Laser2 (D). Após os ciclos de erosão e remineralização, a superfície do esmalte do grupo controle negativo apresenta prismas de esmalte evidenciados (A) e o grupo controle positivo apresenta áreas com prismas de esmalte expostos com diferentes padrões de dissolução (setas brancas – periferia e setas amarelas – centro) (B). Os grupos tratados com laser com túbulos resultaram em uma camada depositada sobre os prismas de esmalte (C e D). Barra de escala: 10 μm .



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 17 - Micrografias representativas (1000x) da superfície do esmalte dos grupos 5 a 8: G5 – flúor + Laser1 (A), G6 – flúor + Laser2 (B), G7 – Laser1 + flúor (C) e G8 – Laser2 + flúor (D). Após os ciclos de erosão e remineralização, a superfície do esmalte do G5 (A) e G7 (C) apresentam superfícies de esmalte mais homogêneas sem exposição dos prismas em comparação aos grupos 6 (B) e 8 (D). Os grupos 6 e 8 apresentam cobertura espessa, porém irregular, com regiões com maior concentração de material (setas amarelas, B e D) e regiões sem depósito de material espesso (setas brancas, D). Barra de escala: 10 μ m.



Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

Tendo em vista a exponencial melhora da qualidade e expectativa de vida e o consequente aumento de remanescente dentários hígidos na cavidade bucal da população, a busca por terapias que possam controlar e prevenir os desgastes dentários e suas consequências, tornam-se cada vez mais procuradas (BISHOP *et al.*, 1997; CATELAN; GUEDES; DOS SANTOS, 2010; LUSSI; CARVALHO, 2014; HARA *et al.*, 2016).

A alteração na estética, sensibilidade dentária, enfraquecimento dos dentes e dificuldade de deglutição e fala, são algumas das consequências da desmineralização da superfície dos dentes proveniente da ação de ácidos (BISHOP *et al.*, 1997; CATELAN; GUEDES; DOS SANTOS, 2010; LUSSI; CARVALHO, 2014; FALLER; NOBLE, 2018).

Desta forma, a terapia mais comumente utilizada para controlar e prevenir lesões de erosão dentária é a fluoroterapia. Sabe-se que o flúor atua aumentando a resistência dos dentes à perda mineral causado pelos ácidos extrínsecos e intrínsecos (GANSS *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2018).

Contudo, somente a aplicação de produtos fluoretados não é suficiente para controlar o processo erosivo, visto que a barreira de fluoreto de cálcio depositada na superfície não é resistente o bastante para prevenir ou controlar completamente o processo erosivo (COMAR *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2018).

Por este motivo, pode-se optar por terapias alternativas, como a terapia com irradiação laser em baixas potências, que permite um aumento da dureza do esmalte pela modificação de sua estrutura cristalina, sem causar efeitos térmicos deletérios (VLACIC, MEYERS; WALSH, 2007; KHOUJA *et al.*, 2017).

Além da utilização desta terapia alternativa isolada, alguns estudos associaram a irradiação laser com a aplicação de produtos fluoretados e verificaram que essa associação também confere uma maior resistência ao esmalte em processos erosivos (VLACIC, MEYERS; WALSH, 2007; MOGHADAM *et al.*, 2018).

Deste modo, o presente estudo utilizou um laser de Diodo, com comprimento de onda de 830nm, no infravermelho próximo, em baixa potência (100mW), variando o tempo e a densidade de energia, aplicado ao esmalte dental. Este estudo foi delineado para se avaliar a resposta da irradiação laser no esmalte erodido na prevenção e controle da erosão dentária extrínseca. Optou-se pelo uso do laser de Diodo em baixa potência como o objetivo de se evitar

alterações térmicas nos tecidos dentários e pelo baixo custo do equipamento, facilitando o acesso em clínica.

Os resultados obtidos pela análise de μ -EDXRF evidenciaram um aumento estatisticamente significativo na relação Ca/P para o grupo controle negativo (AS) após a erosão ($p > 0,05$, Tabela 5) e este fato pode ter ocorrido por uma ligeira diminuição na porcentagem em peso do elemento fósforo (Tabela 4). Estas alterações podem ser possivelmente causadas por uma instabilidade na molécula do fósforo como relatado previamente no estudo de De Carvalho Filho *et al.* (2011). Esta mínima alteração no elemento P e o aumento significativo na relação Ca/P demonstram a capacidade erosiva do suco de laranja e seus efeitos na composição inorgânica do esmalte. De Carvalho Filho *et al.* (2011) reportaram que o pH ácido do suco de laranja gera uma alteração na composição mineral dos dentes, culminando na queda brusca no pH, abaixo do limite crítico, o que aumenta a desmineralização da hidroxiapatita. As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura no presente estudo demonstraram uma superfície irregular e com parcial exposição dos prismas de esmalte, a qual tem relação com a perda de minerais da superfície dos dentes após a ciclagem erosiva (Figura 15a).

Para o grupo controle positivo (FG), foi observado um aumento significativo na relação Ca/P após a erosão ($P < 0,01$, Tabela 5) o qual pode ser explicado pelo aumento não significativo no percentual do elemento Ca e redução não significativa de P (Tabela 4).

Esses resultados podem ser embasados pela ação desmineralizante do suco de laranja (DE CARVALHO FILHO *et al.*, 2011) e pela incapacidade do flúor gel neutro de proteger totalmente o esmalte após um processo erosivo extremo pois não há precipitação suficiente de CaF_2 para auxiliar no aumento da resistência dos dentes aos ácidos (JONES *et al.*, 2002; DE CARVALHO FILHO *et al.*, 2011). As análises de mapeamento em área obtidas por μ -EDXRF complementaram os resultados onde foi possível observar que o grupo controle positivo apresentou menores concentrações de Ca e P ao longo da superfície. Ao mesmo tempo, as micrografias obtidas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) corroboram com os mapeamentos de μ -EDXRF, pois foram observadas áreas com dissolução e exposição dos primas de esmalte (Figura 15B).

Estes resultados também podem ser explicados pela desmineralização promovida pelo ciclo erosivo e pelo menor potencial de proteção do flúor neutro quando comparado ao flúor acidulado relatado em estudos da literatura, visto que o flúor acidulado promove maior precipitação de CaF_2 (DE CARVALHO FILHO *et al.*, 2011).

Após a análise dos grupos irradiados somente com laser, foram verificados aumentos significativos nos teores de Ca ($P < 0,01$) e relação Ca/P ($P < 0,001$, Tabela 4) e no mapeamento

em área para o grupo G3 (L1) (Figuras 13 e 14C). Também foram observados aumentos nos teores de Ca e P para o grupo G3 em comparação com G1 e G2 (Tabela 6).

Esses aumentos poderiam indicar que a irradiação laser promoveu um mínimo incremento de temperatura no local da irradiação, o que aumentaria a absorção das moléculas de água, culminando na degradação do componente orgânico presente no esmalte e alterações na estrutura cristalina no esmalte. Essa hipótese se confirma pela análise de microscopia eletrônica de varredura que demonstrou um aspecto de desorganização dos prismas de esmalte em uma estrutura compacta e não permeável. Esta desorganização poderia acarretar o aumento da rugosidade como observado no grupo G3 ($P < 0,05$) em relação ao G2 (Tabela 7).

Já para o grupo G4 (L2), houve aumento significativo na relação Ca/P ($P < 0,001$, Tabela 4) e no mapeamento em área, com maiores teores de cálcio e fósforo (Figuras 13 e 14D).

Contudo, pela análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi observada uma desorganização dos prismas de esmalte com formação de uma camada mais espessa do que no grupo 3 (Figura 15D). Neste cenário, pode-se sugerir que essa desorganização encontrada nas micrografias obtidas por MEV pode ter sido ocasionada pelos efeitos fotofísicos da irradiação laser e pelo aumento da temperatura no local da irradiação, uma vez que estudos pioneiros evidenciam um aumento de temperatura de até $0,5^{\circ}\text{C}$ durante a irradiação. Porém, em estudos clínicos, esse aumento de temperatura não é significativo (PANHOCA *et al.*, 2015).

Como observado no estudo de Kato *et al.* (2006), não foram encontradas diferenças significativas nos teores de Ca e P para o grupo que associou o flúor ao laser, como no caso do grupo 5, neste estudo, visto que o laser de diodo possui uma baixa absorção em tecidos duros, como o esmalte dental, pois o comprimento de onda na faixa de 800-900 nm, não penetra o suficiente na superfície dos dentes para gerar alterações. Neste caso deve-se aumentar a energia do laser para gerar calor, o que poderia modificar química e fisicamente a estrutura cristalina do esmalte e associar a irradiação à aplicação de corantes na superfície (TAGOMORI; MORIOKA, 1989; KATO *et al.*, 2006; DE SANT'ANNA *et al.*, 2009).

Deste modo, a utilização de corantes ou fotoabsorventes pode ser uma boa alternativa para aumentar a absorção da energia do laser de diodo nos tecidos duros do corpo, como observado nos estudos de De Sant'anna *et al.* 2009, que utilizaram um laser de diodo com comprimento de onda em 810 nm, e foi aplicado um creme fotoabsorvente com ou sem associação ao laser infravermelho e creme fotoabsorvente fluoretado com ou sem associação ao laser infravermelho. Os autores concluíram que houve uma modificação e redução do conteúdo da matriz orgânica do esmalte ocasionando a inibição da difusão iônica através da superfície, o que impediria a desmineralização do esmalte.

Contudo, Ahrari *et al.* 2018 utilizaram um laser de diodo com comprimento de onda de 810 nm e fizeram a associação com um corante comestível azul, a fim de aumentar a absorção do laser no esmalte e melhorar as reações fotoquímicas.

De fato, os corantes auxiliam na absorção da luz nos tecidos, porém, Ahrari *et al.*, (2018) observaram rachaduras no esmalte dental após análise por MEV em seu estudo.

Desta forma, pode-se entender que o corante deva ser utilizado com cautela, bem como os parâmetros do laser, para que não haja a formação de tricas e rachaduras após uma afinidade excessiva com a superfície.

Na análise de mapeamento em área, menores valores de Ca foram observados para o grupo G5, pois os tratamentos realizados não foram suficientes para prevenir ou controlar a ação erosiva do suco de laranja, causando progressão da desmineralização, conforme observado nas imagens de EDXRF (Figura 13E) (DE CARVALHO FILHO *et al.*, 2011).

Na comparação entre o grupo controle positivo e os grupos irradiados, para a relação Ca/P, foram observados menores valores significantes para o grupo G5 ($P < 0,05$, Tabela 6) e este fato pode ser explicado pelo uso do flúor neutro, que possui menor capacidade de resultar na formação de precipitados de CaF_2 na estrutura dentária (DE CARVALHO FILHO *et al.*, 2011).

Houve também uma diminuição da rugosidade de superfície do G5 ($P < 0,001$, Tabela 7) em comparação ao G1, permitindo influir que apesar da baixa capacidade do flúor neutro de promover a deposição de CaF_2 e da baixa absorção do laser pelo esmalte, foi observada uma superfície homogênea, sem exposição dos prismas e desorganização da estrutura cristalina do esmalte, ou seja, foram observadas alterações que podem gerar proteção contra a desmineralização do esmalte dental.

Quando houve a associação do flúor ao laser nos parâmetros L2 (Tabela 2) foram constatados aumentos significativos apenas na relação Ca/P ($P < 0,001$, Tabela 4) pois um ligeiro aumento na porcentagem em peso Ca foi observado, bem como a diminuição significativa na rugosidade de superfície ($P < 0,05$, Tabela 7).

Uma micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (Figura 16B), evidenciou a cobertura dos primas de esmalte, que se explicaria pela maior captação de flúor pelos tecidos e integração de CaF_2 no esmalte dental (LEE *et al.*, 2010; DE CARVALHO FILHO *et al.*, 2011).

Uma ligeira diminuição do teor de P, por conta da instabilidade do elemento P na molécula de hidroxiapatita, também pode confirmar o aumento da relação Ca/P (DE CARVALHO FILHO *et al.*, 2011). A diminuição das concentrações dos elementos Ca e P

(Figura 13 e 14F) observadas nas imagens de distribuição química obtidas dos mapeamentos em área pode ser explicada pelo aumento da dispersão da luz laser em virtude da baixa absorção do comprimento de onda utilizado conforme relatado por De Sant'Anna *et al.* (2009).

Contudo, quando alterou-se a ordem dos tratamentos, iniciando com a irradiação laser seguida do flúor, mesmo com a alteração dos parâmetros de irradiação, não foram constatadas alterações significativas positivas para tais grupos, logo, não foram observadas alterações significantes nas porcentagens em peso dos componentes Ca, P e relação Ca/P para o grupo G7 (L1-FG).

Entre a relação Ca/P ($P < 0,05$), foram constatadas diferenças significativas e menores valores nas comparações entre o grupo G2 e G7 (Tabela 6), o que também foi visto no mapeamento em área pois foram observados menores valores de Ca (Figuras 13G), e também menores valores de P, contudo, em menor evidência (Figura 14G).

Entretanto, foram observados menores valores de rugosidade de superfície (Ra), pois houve uma diminuição significativa do grupo G7 em comparação ao G1 (Tabela 7), desta forma, entende-se que não houve modificação na estrutura cristalina do esmalte por conta da baixa captação da energia laser, mas houve uma influência do flúor gel neutro no tecido dental, o que provavelmente resultou na deposição de fluorapatita por meio da incorporação de fluoreto de cálcio no esmalte dental (LEE *et al.*, 2010; DE CARVALHO FILHO *et al.*, 2011).

Esta influência do flúor também pôde ser vista no estudo de Vitale *et al.* (2011), pois o tratamento de superfície somente com fluoreto de amina em gel aumentou em 7 vezes a captação de flúor em dentes humanos sadios, permitindo inferir que houve aumento da deposição de flúor na superfície do dente, prevenindo a desmineralização do esmalte.

Também demonstrando a relação do flúor com o aumento da resistência do esmalte aos ácidos, o estudo realizado por De Carvalho Filho *et al.* (2011) com a técnica de EDXRF, demonstrou que a aplicação de agentes fluoretados previamente às ciclagens erosivas com suco de laranja e Pepsi Twist® em dentes bovinos foi eficaz no aumento do percentual em peso e proporção de Ca e P, resultando no aumento da proteção do esmalte frente à desafios ácidos.

Após o tratamento L2-FG (G8), foi observada uma diminuição estatisticamente significante nos teores de Ca ($P < 0,001$) e P ($P < 0,01$) (Tabela 4), não sendo observadas alterações na relação Ca/P. Este resultado foi diferente do obtido pelo estudo de Vitale *et al.* (2011) que, após o tratamento de superfície laser + flúor (laser antes da aplicação de flúor), relataram aumentos significativos na incorporação de flúor pelo esmalte.

Vitale *et al.* (2011) utilizaram o comprimento de onda de 809 nm, uma potência de 2W, e realizaram duas irradiações de 20s cada, o que também difere do nosso estudo. Desta forma,

pode-se compreender que a geração de calor por meio de altas potências pode ter tido influência na permeabilidade da superfície de esmalte, permitindo alterações estruturais que determinem um aumento de resistência da estrutura.

Quando comparado ao grupo controle negativo (G1), o grupo G8 evidenciou menores valores de Ca ($P < 0,001$), P ($P < 0,001$) e Ca/P ($P < 0,001$) (Tabela 6), desta forma pode-se compreender que os tratamentos com laser seguido pelo flúor não foram suficientes para prevenir a desmineralização pós ciclo erosivo, visto que as amostras passaram por um desafio ácido extremo (DE CARVALHO FILHO *et al.*, 2011). Também foram observados menores valores de Ca ($P < 0,001$), P ($P < 0,001$) e relação Ca/P ($P < 0,001$) nas comparações entre o grupo controle positivo (G2) e o G8 e este fato pode ter ocorrido por conta da ação isolada do flúor gel neutro no grupo G2, que pode ter modificado a superfície das amostras com a incorporação de CaF_2 aumentando assim, a proteção contra a perda de minerais (LEE *et al.*, 2010; DE CARVALHO FILHO *et al.*, 2011).

Contudo, foi observada uma diminuição significativa da rugosidade (Ra) para o grupo G8 ($P < 0,001$) em comparação com G1, logo, entende-se que o flúor pode ter promovido uma precipitação de CaF_2 no esmalte, inibindo a exposição dos prismas (Tabela 7), bem como observado por microscopia eletrônica de varredura, a qual mostrou uma cobertura irregular sobre o esmalte, podendo influir que houve a deposição irregular de CaF_2 em algumas regiões do esmalte (Figura 16D).

Como forma de analisar a aplicabilidade dos diferentes protocolos alternativos para serem utilizados no controle e prevenção da erosão dentária, foi realizada a inversão da ordem dos tratamentos com flúor e laser, como vistos nos grupos G5-G8, pois os resultados obtidos a partir desses protocolos auxiliam na eleição mais precisa do método mais adequado para um possível e futuro uso em clínica odontológica. Desta forma foi observado que os grupos que iniciaram com a aplicação de flúor e foram seguidos da irradiação laser apresentaram resultados mais expressivos no controle e prevenção da erosão dentária extrínseca.

Este estudo apresenta algumas limitações que podem ter influenciado nos resultados.

Foram utilizados dentes bovinos nos experimentos. Segundo Da Cruz Campos, Campos e Vitral (2008), os dentes bovinos assemelham-se aos dentes humanos em sua morfologia e histologia sendo, portanto, aptos para serem utilizados como modelo em experimentos científicos. Na mesma linha de raciocínio, faz-se necessários estudos *in situ* para avaliar a eficácia dos tratamentos aplicados em uma situação mais próxima da realidade clínica.

Outro ponto que deve ser verificado, é a simulação da higienização dentária em conjunto com o desafio erosivo, pois sabe-se que a associação de fatores erosivos com a abrasão aumenta a progressão da erosão dentária podendo interferir diretamente nos resultados.

Foram analisados neste estudo apenas os resultados após a ciclagem erosiva, desta forma, seria interessante que fossem realizadas as análises antes do processo erosivo.

Para futuros estudos e conhecimento, realizar um polimento da superfície após os tratamentos e ciclagem erosiva torna-se interessante, pois o polimento com uma pasta diamantada de granulação baixa poderia diminuir a rugosidade de superfície diminuindo, portanto, um possível acúmulo de placa dentária que esta superfície rugosa gerada pelo laser poderia causar. Esse acúmulo de placa pode culminar no aparecimento de lesões cariosas e doenças periodontais sendo prejudiciais para a homeostasia da cavidade bucal.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo concluiu que os grupos irradiados G4 (L2) e G6 (F-L2) foram mais efetivos na prevenção e controle do processo erosivo devido à uma melhor cobertura de superfície observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A irradiação somente com o laser de Diodo com densidade de energia de $444\text{J}/\text{cm}^2$ e tempo de 124s (G4 - L2) resultou em uma variação mineral positiva após a erosão dental observado por μ -EDXRF.

O tratamento F-L2 além de apresentar uma melhor cobertura de superfície e uma variação mineral positiva, apresentou também uma menor rugosidade superficial, demonstrando que a irradiação do laser após a aplicação de flúor promove maior resistência aos ácidos extrínsecos.

Deste modo, a irradiação com laser de Diodo de 830 nm em baixas potências, com ou sem associação ao flúor, e nos parâmetros adequados, promove modificações na estrutura cristalina do esmalte. Estes resultados sugerem que a irradiação com estes parâmetros pode ter um efeito positivo na prevenção e controle da erosão dentária extrínseca clinicamente.

REFERÊNCIAS

- AHRARI, F. *et al.* The effect of diode laser irradiation associated with photoabsorbing agents containing remineralizing materials on microhardness, morphology and chemical structure of early enamel caries. **Journal of clinical and experimental dentistry**, v. 10, n. 10, p. e955, 2018.
- AMAECHEI, B. T.; HIGHAM, S. M. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. **Journal of dentistry**, v. 33, n. 3, p. 243-252, 2005.
- BARTLETT, D.; SHAH, P. A critical review of non-cariou cervical (wear) lesions and the role of abfraction, erosion, and abrasion. **Journal of dental research**, v. 85, n. 4, p. 306-312, 2006.
- BISHOP, K. *et al.* Wear now? An update on the etiology of tooth wear. **Quintessence International**, v. 28, n. 5, p. 605-313, 1997.
- BOSKEY, A. L.; MENDELSON, R. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. **Vibrational Spectroscopy**, v. 38, n. 1-2, p. 107-114, 2005.
- CARNEIRO, T. V. *et al.* Estudo in vitro do efeito protetor de vernizes fluoretados frente à erosão em esmalte bovino. **Rev. Bras de Ciências da Saúde**, v. 6, n. 4, p. 559-66, 2012.
- CATELAN, A.; GUEDES, A. P. A.; DOS SANTOS, P. H. Erosão dental e suas implicações sobre a saúde bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia-UPF**, v. 15, n. 1, p. 83-86, 2010.
- CHAND, B.; KULKARNI, S.; MISHRA, P. Inhibition of enamel demineralisation using “Nd-YAG and diode laser assisted fluoride therapy”. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v. 17, n. 1, p. 59-64, 2016
- COMAR, L. P. *et al.* TiF₄ and NaF varnishes as anti-erosive agents on enamel and dentin erosion progression in vitro. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 1, p. 14-18, 2015.
- DA CRUZ CAMPOS, M. I.; CAMPOS, C. N.; VITRAL, R. W. F. O uso de dentes bovinos como substitutos de dentes humanos em pesquisas odontológicas: uma revisão da literatura. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 8, n. 1, p. 127-132, 2008.
- DE-MELO, M. A. *et al.* The effect of diode laser irradiation on dentin as a preventive measure against dental erosion: an in vitro study. **Lasers in medical science**, v. 26, n. 5, p. 615-621, 2011.

DE CARVALHO FILHO, A. C. B. *et al.* Energy dispersive X-ray spectrometry study of the protective effects of fluoride varnish and gel on enamel erosion. **Microscopy research and technique**, v. 74, n. 9, p. 839-844, 2011. .

DE SANT'ANNA, G. R. *et al.* Dental enamel irradiated with infrared diode laser and photoabsorbing cream: Part 1—FT-Raman Study. **Photomedicine and laser surgery**, v. 27, n. 3, p. 499-507, 2009.

FALLER, R.; NOBLE, W. Protection From Dental Erosion: All Fluorides are Not Equal. **Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, NJ: 1995)**, v. 39, n. 3, p. e13-e17, 2018.

FERNANDEZ, C. E. *et al.* Effect of 5,000 ppm fluoride dentifrice or 1,100 ppm fluoride dentifrice combined with acidulated phosphate fluoride on caries lesion inhibition and repair. **Caries research**, v. 51, n. 3, p. 179-187, 2017.

GANSS, C. *et al.* Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. **Caries research**, v. 38, n. 6, p. 561-566, 2004.

GANSS, C.; LUSSI, A.; SCHLUETER, N. The histological features and physical properties of eroded dental hard tissues. In: LUSSI, A.; GANSS, C. (Ed.). **Erosive tooth wear: From Diagnosis to Therapy**. Basel: Karger Publishers, 2014. v.25, p.99-107.

GANSS, C.; SCHLUETER, N.; KLIMEK, J. Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions—a comparison of in vitro and in situ results. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 1, p. 9-14, 2007.

GARONE FILHO, W.; SILVA, V. A. **Lesões Não Cariosas: O Novo Desafio da Odontologia**. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2008.

GIACOMINI, M. C. *et al.* Influence of erosive and abrasive cycling on bonding of different adhesive systems to enamel: An in situ study. **Brazilian dental journal**, v. 27, n. 5, p. 548-555, 2016.

GOMES, R. N. S. **Efeitos de medicamentos pediátricos utilizados no tratamento de doenças respiratórias na estrutura dental**. São José dos Campos, SP, 2017. 43f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2017.

HARA, A. *et al.* Dental surface texture characterization based on erosive tooth wear processes. **Journal of dental research**, v. 95, n. 5, p. 537-542, 2016.

HARA, A. T.; ZERO, D. T. The potential of saliva in protecting against dental erosion. In: LUSSI, A.; GANSS, C. (Ed.). **Erosive Tooth Wear**: Basel: Karger Publishers, 2014. v.25, p.197-205.

HSU, C.-Y. *et al.* Effects of low-energy CO₂ laser irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 9, p. 1725-1730, 2000.

IMFELD, T. Dental erosion. Definition, classification and links. **European journal of oral sciences**, v. 104, n. 2, p. 151-155, 1996.

JONES, L. *et al.* Studies on dental erosion: An in vivo-in vitro model of endogenous dental erosion-its application to testing protection b flouride gel application. **Australian Dental Journal**, v. 47, n. 4, p. 304-308, 2002.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**: texto, atlas, correlações clínicas. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 277 p.

KATO, I. T. *et al.* Effects of 960-nm diode laser irradiation on calcium solubility of dental enamel: an in vitro study. **Photomedicine and Laser Therapy**, v. 24, n. 6, p. 689-693, 2006.

KHOUJA, F. *et al.* Intra-pulpal and subsurface temperature rise during tooth irradiation with 808 nm diode laser: an in vitro study. **European Journal of Paediatric Dentistry**, v. 18, n. 1, p. 56-60, 2017.

LEE, Y. *et al.* Comparison of remineralization effect of three topical fluoride regimens on enamel initial carious lesions. **Journal of dentistry**, v. 38, n. 2, p. 166-171, 2010.

LEME, R. M. P. *et al.* Comparação in vitro do efeito de bebidas ácidas no desenvolvimento da erosão dental: análise por microscopia eletrônica de varredura. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 1, 2011..

LEPRI, T. P. *et al.* Permeability of eroded enamel following application of different fluoride gels and CO₂ laser. **Lasers in medical science**, v. 28, n. 1, p. 235-240, 2013.

LIMA, L. R. Estudo dos efeitos da erosão ácida em restaurações radiculares por fluorescência de raio-x. 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Bioengenharia) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2010.

LINS, R. *et al.* Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 6, p. 849-55, 2010.

LOPES, A. O.; EDUARDO, C.E.; ARANHA, A. C. C. Clinical evaluation of low-power laser and a desensitizing agent on dentin hypersensitivity. **Lasers in medical science**, v. 30, n. 2, p. 823-829, 2015.

LUSSI, A.; CARVALHO, T. S. Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. In: LUSI, A.; GANSS, C. (Ed.). **Erosive Tooth Wear**. Basel: Karger Publishers, 2014. v.25, p.1-15.

LUSI, A.; HELLWIG, E. Risk assessment and preventive measures. **Monogr Oral Sci.**, v. 20, p. 190-199, 2006. doi: 10.1159/000093363.

LUSI, A.; JAEGGI, T.; ZERO, D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. **Caries research**, v. 38, n. Suppl. 1, p. 34-44, 2004.

LUSI, A.; JÄGGI, T. Erosion—diagnosis and risk factors. **Clinical oral investigations**, v. 12, n. 1, p. 5-13, 2008.

MAGALHÃES, A. C. *et al.* Effect of Nd: YAG irradiation and fluoride application on dentine resistance to erosion in vitro. **Photomedicine and laser surgery**, v. 26, n. 6, p. 559-563, 2008.

MAGALHÃES, A. C. *et al.* Insights into preventive measures for dental erosion. **Journal of Applied Oral Science**, v. 17, n. 2, p. 75-86, 2009.

MANTILLA, T. F. *et al.* The in situ effect of titanium tetrafluoride gel on erosion/abrasion progression in human dentin. **Brazilian dental journal**, v. 28, n. 3, p. 337-345, 2017..

MOAZZEZ, R.; BARTLETT, D. Intrinsic causes of erosion. In: LUSI, A.; GANSS, C. (Ed.). **Erosive tooth wear**. Basel: Karger Publishers, 2014. v.25, p.180-196.

MOGHADAM, N. C. Z. *et al.* Effects of laser and fluoride on the prevention of enamel demineralization: an in vitro study. **Journal of lasers in medical sciences**, v. 9, n. 3, p. 177, 2018.

MOURA, S. K. *et al.* Effects of different treatments on chemical and morphological features of eroded dentin. **Lasers Med Sci.**, v. 33, p. 1441–1446, 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10103-018-2482-0>>.

MOYNIHAN, P. J. The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, p. 694-699, 2005.

MULLAN, F. *et al.* Measurement of surface roughness changes of unpolished and polished enamel following erosion. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. e0182406, 2017.

NAHORNY, S. *et al.* Multi-walled carbon nanotubes/graphene oxide hybrid and nanohydroxyapatite composite: A novel coating to prevent dentin erosion. **Materials Science and Engineering: C**, v. 79, p. 199-208, 2017.

NUNN, J. H. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. **European journal of oral sciences**, v. 104, n. 2, p. 156-161, 1996.

ORCHARDSON, R.; GILLAM, D. G. Managing dentin hypersensitivity. **The Journal of the American Dental Association**, v. 137, n. 7, p. 990-998, 2006.

PANHOCA, V. H. *et al.* Comparative clinical study of light analgesic effect on temporomandibular disorder (TMD) using red and infrared led therapy. **Lasers in medical science**, v. 30, n. 2, p. 815-822, 2015.

PRETORIUS, N. E. *et al.* The use of vibrational spectroscopy in the geographic characterization of human teeth: a systematic review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 55, n. 2, p. 105-127, 2020.

RAMALHO, K. M. *et al.* Protective effect of CO₂ laser (10.6 μm) and fluoride on enamel erosion in vitro. **Lasers in medical science**, v. 28, n. 1, p. 71-78, 2013.

RAMOS-OLIVEIRA, T. M. *et al.* Potential of CO₂ lasers (10.6 μm) associated with fluorides in inhibiting human enamel erosion. **Brazilian oral research**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2014.

RANDAZZO, A.; AMORMINO, S. D. F.; SANTIAGO, M. D. O. Erosão dentária por influência da dieta. Revisão da literatura e relato de caso clínico. **Arq Bras de Odont**, Belo Horizonte, v.2, n.1 , p.10-16, jan./jul. 2006.

SAR SANCAKLI, H. *et al.* The influence of varnish and high fluoride on erosion and abrasion in a laboratory investigation. **Australian dental journal**, v. 60, n. 1, p. 38-42, 2015.

SCHMIDLIN, P. R. *et al.* CO₂ laser-irradiation through topically applied fluoride increases acid resistance of demineralised human enamel in vitro. **Oral health & preventive dentistry**, v. 5, n. 3, 2007.

SHELLIS, R. P.; ADDY, M. The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. In: LUSSI, A.; GANSS, C. (Ed.). **Erosive tooth wear: From Diagnosis to Therapy**. Basel: Karger, 2014. v.25, p.32-45.

- SHIPLEY, S.; TAYLOR, K.; MITCHELL, W. Identifying causes of dental erosion. **General dentistry**, v. 53, n. 1, p. 73-5; quiz 76, 71-2, 2005.
- SOARES, L. E. S. *et al.* Surface characteristics of a modified acidulated phosphate fluoride gel with nano-hydroxyapatite coating applied on bovine enamel subjected to an erosive environment. **Microscopy research and technique**, v. 81, n. 12, p. 1456-1466, 2018.
- SOARES, L. E. S.; DE CARVALHO FILHO, A. C. B. Protective effect of fluoride varnish and fluoride gel on enamel erosion: roughness, SEM-EDS and μ -EDXRF studies. **Microscopy research and technique**, v. 78, n. 3, p. 240-248, 2015.
- SOARES, L. E. S. *et al.* Chemical and morphological evaluation of enamel and dentin near cavities restored with conventional and zirconia modified glass ionomer subjected to erosion-abrasion. **Microscopy research and technique**, v.82, n.7, p.1114-1126, 2019.
- SOBRAL, M. A. P. *et al.* Influência da dieta líquida ácida no desenvolvimento de erosão dental. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 406-410, 2000. .
- TAGOMORI, S.; MORIOKA, T. Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel (with 1 color plate). **Caries research**, v. 23, n. 4, p. 225-231, 1989.
- TSAI, Chia-Ling *et al.* In Vitro Acid Resistance of CO₂ and Nd-YAG Laser-Treated Human Tooth Enamel. **Caries Research**, v. 36, n.6, p.423-429, Nov-Dec 2002. doi: 10.1159/0000665.
- TEN CATE, J. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. **European journal of oral sciences**, v. 105, n. 5, p. 461-465, 1997.
- VAN RIJKOM, H. *et al.* Erosion-inhibiting effect of sodium fluoride and titanium tetrafluoride treatment in vitro. **European journal of oral sciences**, v. 111, n. 3, p. 253-257, 2003.
- VILLALBA-MORENO, J. *et al.* Increased fluoride uptake in human dental specimens treated with diode laser. **Lasers in medical science**, v. 22, n. 3, p. 137-142, 2007.
- VITALE, M. *et al.* Diode laser irradiation and fluoride uptake in human teeth. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v. 12, n. 2, p. 90-92, 2011.
- VLACIC, J. *et al.* Laser-activated fluoride treatment of enamel against an artificial caries challenge: comparison of five wavelengths. **Australian dental journal**, v. 52, n. 2, p. 101-105, 2007.

VLACIC, J.; MEYERS, I.; WALSH, L. Laser-activated fluoride treatment of enamel as prevention against erosion. **Australian dental journal**, v. 52, n. 3, p. 175-180, 2007.

WAHENGBAM, P.; TIKKU, A.; LEE, W. B. Role of titanium tetrafluoride (TiF₄) in conservative dentistry: A systematic review. **Journal of conservative dentistry: JCD**, v. 14, n. 2, p. 98, 2011.

WANG, Y.-L. *et al.* Effects of fluoride and epigallocatechin gallate on soft-drink-induced dental erosion of enamel and root dentin. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 117, n. 4, p. 276-282, 2018.

WEGEHAUPT, F. J. *et al.* Anti-erosive potential of amine fluoride, cerium chloride and laser irradiation application on dentine. **Archives of oral biology**, v. 56, n. 12, p. 1541-1547, 2011.

WEST, N. X. Dentine hypersensitivity: preventive and therapeutic approaches to treatment. **Periodontology 2000**, v. 48, n. 1, p. 31-41, 2008.

WIEGAND, A.; ATTIN, T. Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions--a review. **Oral health & preventive dentistry**, v. 1, n. 4, 2003. ISSN 1602-1622.

ZHONG, W. *et al.* Age and sex patterns of drug prescribing in a defined American population. **Mayo Clinic Proceedings**, v.88 n.7, p.697-707, 2013.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELO CEUA



UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
 Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da Aplicação do Laser de Diodo na Prevenção e Controle da Erosão Dentária Extrínseca", registrada com o protocolo nº A03/CEUA2019, sob a responsabilidade de Luís Eduardo Silva Soares que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), em reunião de 23 / 04 / 2019.

- Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 27/05/2019 a 28/02/2019
- Espécie/linhagem/raça: grandes animais (equinos, bovinos, suínos ou pequenos ruminantes) e pequenos animais (cães e gatos).
- Nº de animais autorizados: 5
- Peso/Idade: não se aplica
- Sexo: impossível prever, (de acordo com a disponibilidade)
- Origem (fornecedor): Frigorífico Mondelli Industria de Alimentos S/A. CNPJ 45.007.630/0004-79

Cristina Pacheco Soares
 Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares

Coordenadora CEUA-UNIVAP

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
 IP&D - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
 Av. Shishima Hifumi, 2911 - Urbanova CEP 12244-000 PABX(012) 349.1000 FAX(012) 349.1252 Caixa Postal 82 S.J.Campos-SP

Email: ceua@univap.br